

SCIENCES DE LA VIE

DEUG - Licence - CPGE - PCEM
CAPES - Agrégation

3e édition

D. Robert, B. Vian



Éléments de biologie cellulaire

doin

SCIENCES DE LA VIE
DEUG - Licence - CPGE - PCEM
CAPES - Agrégation

Éléments de biologie cellulaire

Daniel Robert
Professeur des Universités

Brigitte Vian
Maître de conférences des Universités

3e édition

doin

Photo de couverture : Cellule de racine de maïs en mitose : télophase et développement du phragmoplaste. Cliché obtenu en microscopie confocale à balayage laser.
Techniques utilisées : en bleu, marquage cytochimique de l'ADN des chromosomes en cours de décondensation ; en vert, immunomarquage des microtubules du fuseau ; en rouge, immunomarquage d'une protéine membranaire liée à la plaque cellulaire.
(Cliché B. Satiat-Jeunemaitre et M.-T. Crosnier)

DOIN ÉDITEURS
Groupe Liaisons SA
1, avenue Édouard-Belin
92856 Rueil-Malmaison Cédex

ISBN : 2-7040-1169-9

Imprimé en France

Table des matières

Première partie

LA CELLULE ET SES CONSTITUANTS MOLÉCULAIRES

Seconde partie

LES COMPARTIMENTS CELLULAIRES ET LEURS FONCTIONS

Liste des encadrés

Abréviations utilisées

^3H : Tritium
A : Adénine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
AMP : Adénosine monophosphate
APS : Réaction acide periodique-Schiff
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messager
ARNr : Acide ribonucléique ribosomal
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
ATP : Adénosine triphosphate
C : Cytosine
Da : Dalton
DNase : Désoxyribonucléase
EDTA : Ethylène diamine tétra-acétate
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FMN : Flavine adénine mononucléotide
G : Guanine
G1 : Phase de présynthèse
G2 : Phase de postsynthèse
GDP : Guanosine diphosphate
GTP : Guanosine triphosphate
HIV : *Human immunodeficiency virus*
Ig : Immunoglobuline
IgG : Immunoglobuline G
Kcal : Kilocalorie
kDa : Kilodalton
Kilobase : 1 000 bases
K_m : Constante de dissociation de Michaelis-Merten
M : Mitose
MM : masse moléculaire
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NANA : acide N-acétylneuraminique
PATAg : Réaction acide periodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent
pb : Paire de bases
Pi : Phosphate inorganique
RER : Réticulum endoplasmique rugueux
RNase : Ribonucléase
S : Phase de synthèse
SER : Réticulum endoplasmique lisse
Sida : Syndrome d'immunodéficience acquis
T : Thymine
UV : Ultraviolet
V_{max} : Vitesse maximale d'une réaction

Principales unités utilisées

μm : micromètre = micron = 10^{-3} mm
nm : nanomètre = 10^{-6} mm = 10^{-3} μm
Å : Angström = 10^{-7} mm = 10^{-4} μm = 0,1 nm
J : joule = 0,239 calories

Avant-propos

Une part importante de l'enseignement de la biologie en premier cycle des Universités (DEUG et PCEM) et dans les classes préparatoires aux grandes écoles est consacrée à l'étude de la cellule. Au cours de cette période les étudiants doivent acquérir de solides notions sur l'organisation et les modalités du fonctionnement de cette unité du monde vivant et établir les liens existant entre les structures et les fonctions.

Les progrès considérables réalisés en biochimie au cours des 50 dernières années, en grande partie grâce à la mise au point de techniques d'analyse très douces et performantes, ont permis l'étude *in vitro* et *in vivo* des macromolécules biologiques, ces échafaudages moléculaires énormes, complexes et fragiles, qui sont les éléments de base des structures cellulaires et dont l'organisation tridimensionnelle conditionne les propriétés biologiques. C'est au niveau des interactions moléculaires et macromoléculaires que l'on cherche maintenant à comprendre les mécanismes du vivant ; les nouveaux concepts, cette fois de biologie et de génétique moléculaires, qui ont découlé des travaux réalisés au cours des 30 dernières années, ont donc considérablement bouleversé notre compréhension de la cellule.

C'est pourquoi il est indispensable que l'étudiant possède un minimum de connaissances en biochimie ; celles-ci doivent lui permettre de comprendre les modalités d'édification des structures à partir des macromolécules et la nature des réactions auxquelles celles-ci participent. La première partie de cet ouvrage est, en conséquence, consacrée à la biochimie structurale, prérequis obligatoire pour aborder la biologie cellulaire *stricto sensu*. Il ne s'agit pas pour autant d'entreprendre l'étude exhaustive des très nombreuses molécules biologiques et de leurs propriétés, mais plutôt de préciser les règles dirigeant leur conformation dans l'espace, le plus souvent spécifique, conformation que de puissants ordinateurs peuvent prédire à partir de paramètres que leur fournissent les chercheurs ; les modèles proposés par ces nouvelles méthodes d'approche permettent de considérer les réactions biologiques sous un jour nouveau. Il devient ainsi possible de définir les caractéristiques essentielles de ces macromolécules et surtout d'établir leurs interactions dans l'environnement si particulier de la cellule où l'eau, cette molécule exceptionnelle, est l'élément dominant.

Dans la seconde partie de l'ouvrage, les différentes fonctions cellulaires sont analysées les unes après les autres, ce qui reste la méthode la plus simple (et la plus traditionnelle) pour comprendre les mécanismes complexes du vivant, tout en s'efforçant de dégager les interconnexions qui existent.

Cet ouvrage n'est pas un traité, c'est un cours rédigé dans l'esprit et, autant que possible, la forme avec lesquels il est exposé oralement aux étudiants de l'université. Son but n'est donc pas de présenter l'ensemble de nos connaissances sur la vie cellulaire. Étant donné la complexité et la diversité des mécanismes mis en œuvre par les cellules, des choix ont été faits, et de nombreuses simplifications réalisées. De même pour favoriser la compréhension, les schémas ont le plus souvent été préférés aux documents photographiques pourtant si nombreux dans la littérature scientifique. Ces méthodes d'approche plus aisées sont cependant très réductrices ; l'étudiant devra en tenir compte et savoir que des traités très complets sont actuellement disponibles pour ceux qui voudraient approfondir les données acquises et prendre en compte l'extraordinaire diversité du monde vivant.

Il ne faut pas pour autant considérer que les différents chapitres sont traités de manière superficielle ; les structures et les mécanismes cellulaires sont toujours étudiés en intégrant le niveau moléculaire car c'est le seul niveau où il est réellement possible de comprendre totalement le déroulement d'un processus biologique. Sans pour autant négliger la mémorisation, c'est cette compréhension que l'étudiant devra privilé-

gier, c'est elle en effet qui lui permettra d'aborder ultérieurement, dans les meilleures conditions, l'étude des modalités accompagnant la différenciation cellulaire au sein d'organismes complexes.

Les différents chapitres couvrent des thèmes qui, selon les établissements ou les cursus, sont abordés à des moments différents. Il nous a paru utile de les traiter tous sans chercher à adapter l'ouvrage à un programme particulier.

Les techniques expérimentales et l'interprétation des résultats qu'elles fournissent sont à la source de la connaissance que nous avons des mécanismes biologiques. Ces techniques et les appareillages auxquels elles font appel sont de plus en plus sophistiqués; leur présentation en début ou en fin d'ouvrage a souvent un aspect rébarbatif et d'autant plus difficile à comprendre que l'étudiant n'a généralement pas la possibilité de les utiliser lui-même. Dans ce volume, chaque fois que cela est possible, la présentation d'une technique accompagne l'exposé du problème qu'elle a permis de résoudre; la compréhension des méthodes employées et celle des mécanismes étudiés en sont ainsi simultanément facilitées.

Cet ouvrage, nécessairement très incomplet étant donné l'importance des connaissances déjà acquises et de leur évolution très rapide puisque chaque année plusieurs milliers d'articles sont publiés dans des revues spécialisées, doit être considéré comme une introduction à la biologie cellulaire, le but recherché étant de donner une base solide aux étudiants qui ont le goût pour l'étude du vivant et qui désirent progresser dans cette voie *.

Avant-propos de la nouvelle édition

Cette nouvelle édition des *Éléments de biologie cellulaire* a permis d'apporter un certain nombre de retouches ponctuelles, de corriger des erreurs matérielles et, tenant compte des suggestions faites par certains lecteurs, d'améliorer la présentation de nombreux schémas ou la rédaction de quelques paragraphes. Mais des modifications plus importantes se sont également avérées nécessaires.

L'évolution rapide de nos connaissances dans le domaine de la biologie cellulaire a nécessité, même pour un ouvrage destiné à des étudiants débutant l'étude de la cellule, des remaniements substantiels de certains chapitres.

Par ailleurs, il a paru intéressant d'introduire dans ce volume de nouveaux encadrés apportant des informations complémentaires sur des sujets d'actualité ou dans des domaines qui dépendent plus de la biologie moléculaire que de la biologie cellulaire *stricto sensu*. De nombreuses techniques de biologie moléculaire sont en effet des outils pour le biologiste cellulaire moderne; il est souvent fait référence à certaines d'entre elles dans les médias et il nous a semblé indispensable d'en donner au moins le principe aux futurs biologistes. Plutôt que d'en faire un chapitre spécial, consacré au génie génétique ou à l'ingénierie de l'ADN, nous avons préféré placer des encadrés traitant de ces sujets dans les chapitres où sont présentés les concepts permettant de comprendre la méthodologie employée ou dans ceux pour lesquels la technique a facilité la résolution de problèmes biologiques.

Le but de l'ouvrage n'a cependant pas changé: c'est la compréhension des mécanismes biologiques qui est privilégiée plus qu'une connaissance exhaustive des processus mis en œuvre.

---

* Nous tenons à évoquer la mémoire de notre collègue Daniel SANDOZ, Professeur à l'Université P. et M. Curie, qui a su, par son dynamisme, largement contribuer au renouveau de la biologie cellulaire.

Première partie

LA CELLULE ET SES CONSTITUANTS MOLÉCULAIRES

CHAPITRE I

Caractéristiques des êtres vivants

Tous les êtres vivants sont constitués de *cellules*, c'est-à-dire d'unités structurales fondamentales limitées par une membrane, contenant une information génétique et capables de vivre de façon autonome quand elles sont dans un environnement favorable. Étudier la biologie cellulaire c'est étudier la vie elle-même sous sa forme la plus élémentaire. Les cellules isolées, telles les bactéries, représentent la forme de vie la plus simple, chaque cellule étant capable de croître et de se diviser. Le plus souvent les organismes sont construits à partir de milliards de cellules groupées en tissus, ayant des fonctions différentes et complémentaires, et reliées par des systèmes de communication. Dans ce cours de biologie cellulaire on s'efforcera de rechercher ce qui fait l'*unité des cellules* plutôt que les causes de leur diversité.

1. ANALYSE DU COMPORTEMENT D'UNE CULTURE CELLULAIRE

Les caractéristiques des êtres vivants peuvent être dégagées à partir de l'observation expérimentale d'une culture de cellules isolées. Un exemple classique est celui d'une culture bactérienne, par exemple le colibacille, *Escherichia coli*. Le colibacille est une bactérie non pathogène présente dans le gros intestin des Mammifères. Sans entrer ici dans le détail des caractéristiques cellulaires et subcellulaires de ces bactéries (voir 3.2), il est possible d'observer le comportement d'une population de colibacilles mis en culture *in vitro*, dans des conditions d'asepsie, en milieu liquide approprié. La culture est incubée à 37 °C sous agitation permanente. Une fraction aliquote de la culture est prélevée à intervalles réguliers et la densité cellulaire est mesurée au spectrophotomètre. Une courbe de cette densité exprimée en fonction du temps *(fig. I-1)* montre que 3 phases sont reconnaissables :

– une **phase exponentielle** au cours de laquelle le nombre de bactéries augmente de façon très importante (logarithmique). Les bactéries sont capables de croissance et de division. C'est pendant cette phase que le *temps de génération* peut être évalué : il correspond au temps nécessaire pour que la quantité de cellules double. Dans les conditions standard, pour une culture de colibacilles le temps de génération est de l'ordre de 60 minutes ;

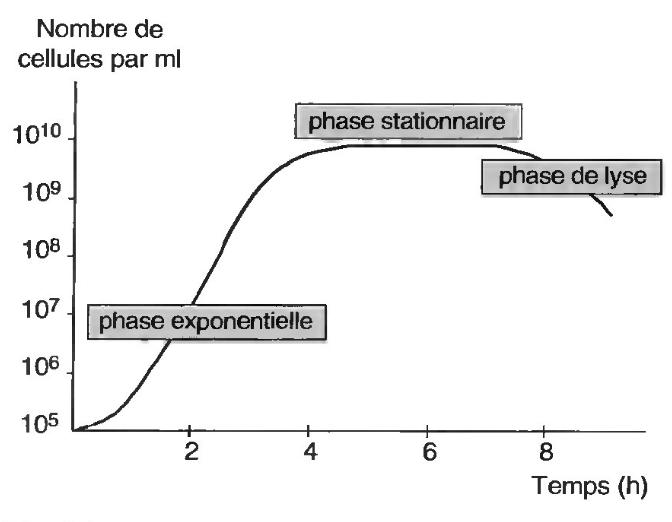


Fig. I-1 : Courbe de croissance d'une culture de colibacilles *in vitro*.

– une **phase stationnaire** au cours de laquelle le nombre de bactéries n'augmente plus. Une observation des cellules montre que, autour d'une concentration de 10^9 bactéries par millilitre, les cellules restent petites. Les conditions sont devenues défavorables : les bactéries ne peuvent plus croître et se diviser ;

– une **phase de lyse** des bactéries au cours de laquelle les cellules meurent.

À partir de ces simples observations il est ainsi possible de dégager les caractéristiques communes aux différentes cellules.

2. PROPRIÉTÉS COMMUNES AUX DIFFÉRENTS TYPES CELLULAIRES

2.1. STOCKAGE ET TRANSMISSION DES INFORMATIONS GÉNÉTIQUES

Au cours de la phase exponentielle les bactéries se divisent un grand nombre de fois. Les cellules nouvellement formées sont tout à fait identiques aux bactéries initiales. Il existe donc un programme qui doit être transmis de génération en génération. Ce programme constitue l'**information génétique** propre à toutes les cellules quel que soit leur niveau de développement. Ce programme est habituellement stocké dans une macromolécule, l'ADN ou acide désoxyribonucléique (*fig. I-2*).

Plusieurs aspects concernant cette information génétique seront envisagés :

– la nature de ce programme et son mode de stockage (1re partie, chap. VI) ;

– la façon dont ce programme peut être « recopié » par autoréplication avant d'être transmis aux cellules issues de la division (2e partie, chap. IX).

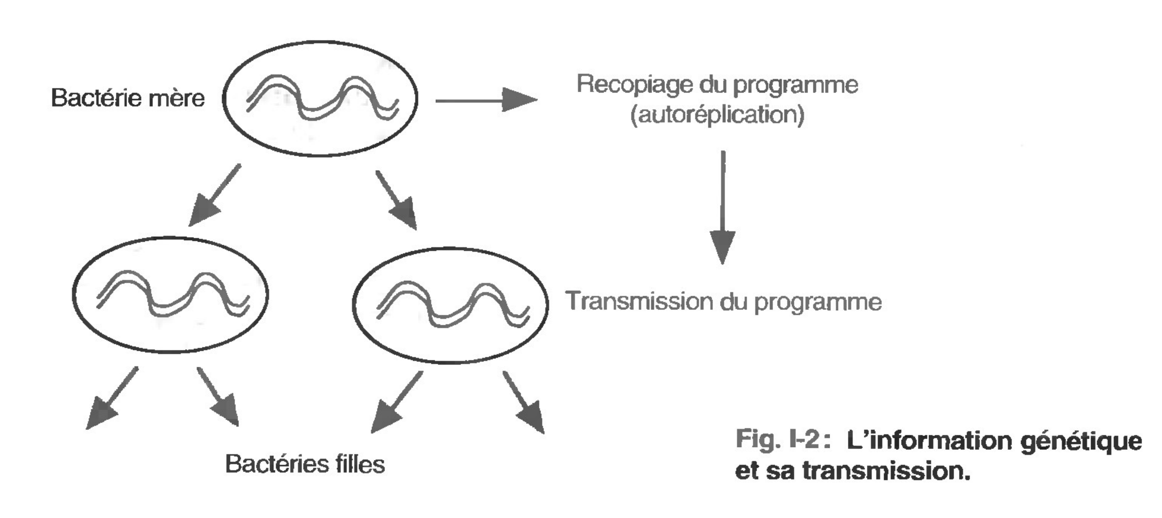


Fig. I-2 : L'information génétique et sa transmission.

2.2. SYNTHÈSE DE MACROMOLÉCULES SPÉCIFIQUES

A. Les macromolécules biologiques

La possibilité qu'ont les bactéries de croître et de se diviser lorsque les conditions sont les plus favorables (phase exponentielle) implique que les cellules sont capables de synthétiser les matériaux qui les constituent. Une des caractéristiques des êtres vivants est en particulier de pouvoir construire des composés carbonés qui sont des *macromolécules*, c'est-à-dire des édifices dont les dimensions sont énormes pour le chimiste et juste perceptibles pour le cytologiste (celui qui étudie la cellule). Les macromolécules sont fabriquées à partir de *motifs moléculaires* relativement simples, appartenant à quelques dizaines d'espèces chimiques distinctes. Ces unités élémentaires sont enchaînées par des liaisons covalentes, c'est-à-dire des liaisons nécessitant l'intervention d'enzymes et l'utilisation d'énergie pour leur établissement.

B. Homopolymères et hétéropolymères. Importance des molécules séquencées

Si les motifs moléculaires (ou monomères) sont tous identiques, la macromolécule construite est un *homopolymère*, c'est-à-dire un polymère de structure *monotone*. Au contraire si les monomères sont différents, la macromolécule est un *hétéropolymère*, c'est-à-dire une molécule possédant une *séquence* *(fig. I-3)*.

L'importance des macromolécules séquencées (acides nucléiques, protéines, glycoprotéines et glycolipides), molécules chargées d'information, sera abordée en détail. Pour les protéines par exemple, on verra que les séquences renferment l'information qui détermine la conformation tridimensionnelle de leur surface et par là-même leur activité biologique.

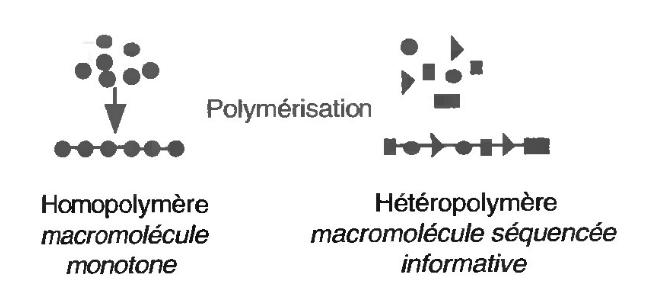


Fig. I-3 : Homopolymères et hétéropolymères.

2.3. GESTION DE L'ÉNERGIE

A. L'énergie et le maintien de l'ordre en biologie

Les cellules obéissent aux lois de la physique et de la chimie. En vertu du deuxième principe de la thermodynamique on sait que, dans tout système isolé, la quantité de désordre ne fait qu'augmenter. *Or les êtres vivants sont parfaitement ordonnés.* L'observation de la culture bactérienne montre à première vue qu'un ordre doit être maintenu pour permettre aux cellules de croître et subsister. On verra tout au long de ce volume que les êtres vivants construisent en permanence des structures très ordonnées, que ce soient les macromolécules elles-mêmes ou des assemblages supra-moléculaires. *Ceci n'est thermodynamiquement possible que par un apport continuel d'énergie que les êtres vivants sont capables de puiser dans leur environnement.*

B. Autotrophes et hétérotrophes

À plus ou moins long terme, l'énergie utilisée par les cellules provient du soleil. Le soleil émet un rayonnement électromagnétique qui contient une certaine quantité d'énergie utilisable. Les plantes vertes, c'est-à-dire les organismes **autotrophes,** sont capables de transformer l'énergie lumineuse du soleil en énergie chimique. C'est le mécanisme de la photosynthèse au cours de laquelle sont synthétisées les macromolécules organiques, en général des glucides, avec dégagement d'oxygène dans l'atmosphère. Les animaux, c'est-à-dire les organismes **hétérotrophes,** tirent leur énergie du prélèvement de ces molécules combustibles *(fig. I-4)*.

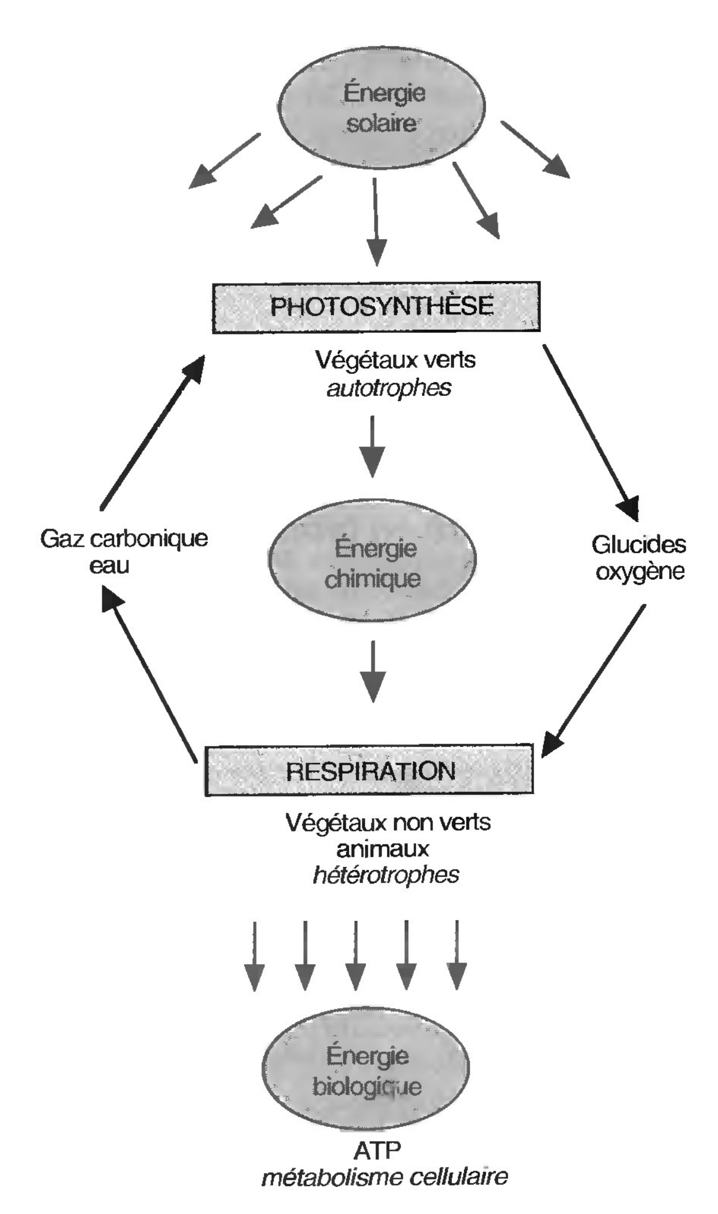


Fig. I-4 : L'énergie dans le monde biologique.

2.4. ADAPTATION AUX CONDITIONS EXTÉRIEURES

L'observation de la population bactérienne en culture révèle que, au bout de quelques heures, la croissance et la division des bactéries sont freinées et finissent par s'arrêter. La troisième phase de la courbe indique même que, à un certain moment, la vie s'interrompt. Les facteurs limitants sont les conditions qui règnent dans la fiole de culture et qui deviennent défavorables. Pour une certaine masse de bactéries la teneur en oxygène devient insuffisante, la quantité de matériel nutritif devient trop faible et trop de déchets s'accumulent dans le milieu. Les cellules sont donc soumises à des *contraintes extérieures* dont elles perçoivent les *signaux*. En changeant les conditions de milieu on pourrait théoriquement prolonger indéfiniment la phase exponentielle et les cellules garderaient leur propriété de proliférer.

Dans les organismes plus complexes, les cellules reçoivent toute une série de signaux, en particulier au niveau de leur membrane plasmique (2e partie, chap. I). Des régulations empêchent en particulier la prolifération excessive des cellules. Des signaux sont échangés en permanence pour assurer la coordination de toutes les réactions chimiques. Lorsque ce contrôle est déréglé, les cellules deviennent sourdes à de nombreux signaux, un désordre intervient et c'est par exemple la naissance d'un *cancer*.

C. *L'importance de l'ATP*

Les molécules combustibles sont « brûlées » par les cellules au cours de la respiration cellulaire. Au cours de ce processus l'énergie provenant de la dégradation est stockée transitoirement dans l'ATP (adénosine triphosphate), sorte de crédit d'énergie, de monnaie d'échange circulante utilisable par tous les êtres vivants pour n'importe quel besoin.

3. LES ORGANISMES CELLULAIRES

Les organismes vivants sont tous formés de cellules. Quelques-uns ne sont constitués que par une seule cellule, par exemple le colibacille ou l'amibe. La plupart des organismes renferment un nombre gigantesque de cellules, qui peut atteindre le chiffre de 10^{14} chez l'homme par exemple. Toutes les cellules ont en commun d'être limitées par une *membrane plasmique*, assemblage macromoléculaire fait de lipides et de protéines qui assure leur individualité. Ce qui va différencier les cellules et être à la base d'une première classification est la façon dont le matériel génétique est organisé. Ainsi on distinguait classiquement :

– les *Procaryotes* (du grec *pro*, primitif, *karuon*, noyau), chez lesquels l'information génétique n'est pas séparée du reste de la cellule. Il n'existe donc pas de noyau défini ;

– les *Eucaryotes* (du grec *eu*, bon, *karuon*, noyau), chez lesquels l'information génétique est stockée dans un noyau, c'est-à-dire un compartiment séparé du reste de la cellule par une enveloppe.

Cette division du monde du vivant en deux grands ensembles s'est depuis quelque temps révélée inexacte à la lumière des récents développements d'études de phylogénie moléculaire, en particulier en ce qui concerne les Procaryotes. Trois domaines d'organismes vivants sont maintenant distingués : les Archébactéries (ou Archées), les Eubactéries et les Eucaryotes.

3.1. LES ARCHÉBACTÉRIES

Différentes des autres Procaryotes par quelques caractères biochimiques, physiologiques et génétiques (absence de peptidoglycane dans la paroi, présence de nucléotides particuliers, présence de gènes propres...), les Archébactéries (du grec *arkhaios*, ancien) ont été ainsi nommées, car on a longtemps pensé qu'elles constituaient le groupe phylogénétiquement le plus ancien. Elles sont en effet capables de se développer dans les milieux les plus inhospitaliers, sans doute très semblables à ceux dans lesquels ont vécu les organismes les plus primitifs il y a 3,5 à 3,8 milliards d'années. Dans ce groupe on distingue les archébactéries méthanogènes capables de produire du méthane à partir du CO_2, les archébactéries halophiles vivant dans des milieux très salés et les archébactéries thermophiles extrêmes vivant dans des milieux de température très élevée (entre 60 °C et 80 °C et même au-delà). Ce groupe ne fera pas l'objet d'études détaillées dans le présent ouvrage.

3.2. LES EUBACTÉRIES : LE MODÈLE PROCARYOTE

Les Eubactéries (étymologiquement « vraies bactéries ») sont choisies dans cet ouvrage comme représentant le modèle procaryote. Nous analyserons deux exemples qui diffèrent selon leur capacité ou non de capter l'énergie lumineuse du soleil dans le mécanisme de photosynthèse.

A. *Organisation d'une bactérie non photosynthétique*

La bactérie *Escherichia coli,* ou colibacille, peut être choisie comme exemple de bactérie non photosynthétique. Il s'agit d'un organisme unicellulaire. La cellule est de petite taille, de forme cylindrique, mesurant environ 2 µm de long et 0,8 µm de large. Son organisation ne peut donc être vue distinctement qu'au microscope électronique (voir sur la *figure I-5* les limites du pouvoir de résolution de l'œil humain et des appareils d'observation).

La surface de la bactérie est recouverte de flagelles et de poils qui servent respectivement d'organes de locomotion et d'organes adhésifs. On peut reconnaître successivement *(fig. I-6)*:

– la **paroi bactérienne** entourant la cellule. C'est une enveloppe constituant un gel péricellulaire relativement mince, fait de peptidoglycane, c'est-à-dire d'un assemblage de protéines et de sucres. Chez *E. coli* la paroi est

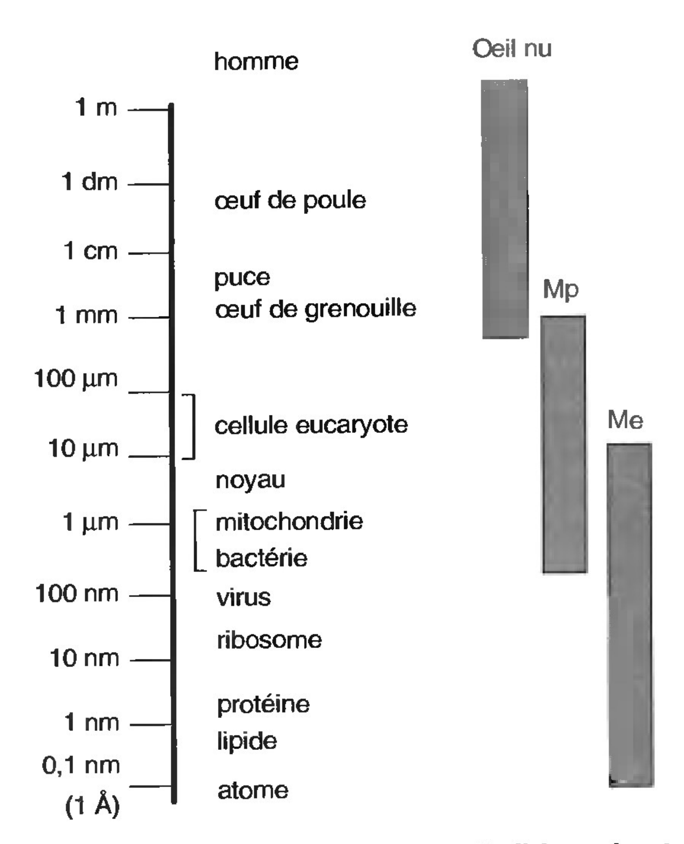


Fig. I-5 : **Pouvoir de résolution de l'œil humain et des microscopes photonique (Mp) et électronique (Me).**

sol. C'est un compartiment riche en eau, en sels minéraux, en ions et en molécules très variées (enzymes, acides aminés, oses, ARNm, ARNt, etc.). Des granules sont parfois des sites de stockage de réserves ;

– le **nucléoïde bactérien** occupe dans le cytoplasme un très grand volume. C'est le chromosome bactérien, siège de l'information génétique, fait d'une seule longue molécule d'ADN (variant entre 750000 et 5.10^6 paires de bases selon les espèces, voir chap. II, 2e partie pour plus de détails). Chez le colibacille ce matériel est organisé en un peloton très compacté, probablement fixé en un point de la membrane plasmique. Outre le chromosome bactérien on rencontre parfois dans la cellule un ou plusieurs **plasmides**, petites molécules circulaires d'ADN extrachromosomique. Il sera vu plus tard que ces plasmides portent une information qui confère à la bactérie ses propriétés de résistance aux antibiotiques. Dans la dernière décennie les plasmides se sont révélés très importants dans la mesure où ils servent de transporteurs de gènes dans les opérations de génie génétique.

relativement mince. Lorsque la paroi est éliminée par voie enzymatique, la cellule nue devient sphérique : la paroi permet donc à la cellule de maintenir sa forme. Elle lui assure aussi une protection en créant un milieu très hydraté autour de la cellule ;

– la **membrane plasmique** se trouve juste sous la paroi. Elle est formée d'une double couche phospholipidique associée à des protéines. C'est la membrane plasmique qui permet à la cellule de contrôler de façon très précise le passage des substances contenues dans le milieu extérieur et qui sont nécessaires au métabolisme cellulaire. C'est aussi au niveau de la membrane plasmique que sont localisées les protéines impliquées dans la gestion de l'énergie et la synthèse de l'ATP ;

– le **cytoplasme** de la bactérie est très dense. Au microscope électronique on peut identifier une très grande quantité de granules très colorables, les ribosomes (20000 à 30000 par cellule), soit libres, soit liés en polysomes (ateliers de synthèse protéique) dans le cyto-

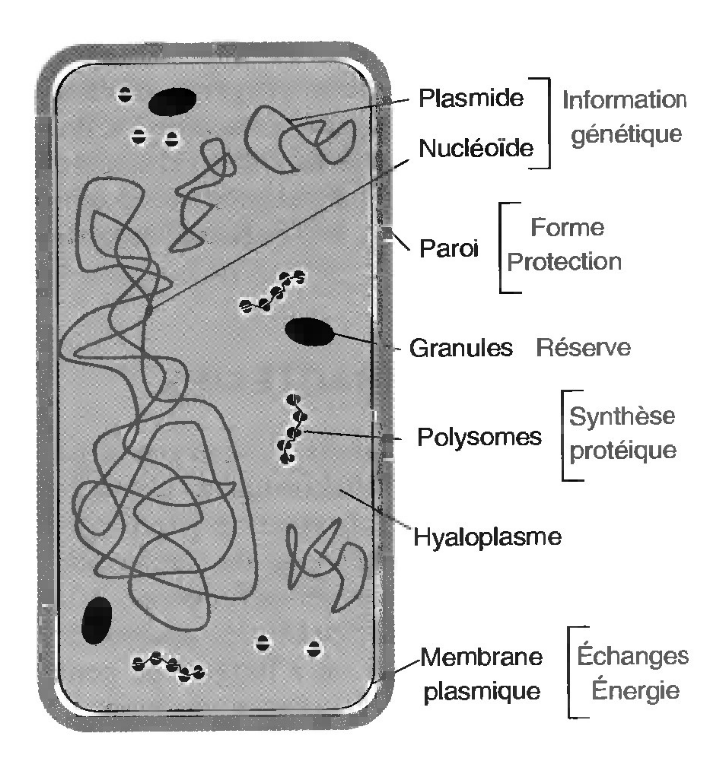


Fig. I-6 : **Organisation d'un colibacille.**
Les flagelles et les cils ne sont pas représentés.

La plupart des Procaryotes sont construits selon ce modèle assez simple. C'est en fait par leur enveloppe que les bactéries révèlent leur individualité. On distingue deux groupes de bactéries selon leur propriété d'être ou non colorées par le colorant de Gram (du nom d'un microbiologiste danois). La réaction de Gram est fondée sur des différences de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool, c'est-à-dire à un solvant des lipides. Toutes les cellules bactériennes peuvent absorber un colorant, le violet de Gentiane, qui associé au lugol (réactif riche en iode) précipite alors dans les cellules. Deux cas peuvent alors exister lorsqu'un traitement à l'alcool suit cette coloration :

– les bactéries dont la paroi comporte un peptidoglycane complexe et épais ne laissent pas passer l'alcool et restent donc colorées en violet. Ce sont les **bactéries à Gram positif**, telles les bactéries du groupe *Bacillus* (*fig. I-7, A*). Dans certains cas le peptidoglycane massif peut atteindre 50 % du poids de la cellule ;

– les bactéries dont la paroi comporte beaucoup de lipides laissent passer l'alcool qui détruit le complexe coloré. Ce sont les **bactéries à Gram négatif**, telles que *Escherichia coli*, dont le peptidoglycane est très mince. Ces bactéries possèdent une seconde membrane phospholipidique, la membrane externe, entourant le peptidoglycane et dans laquelle on a identifié des protéines de transport, les porines. Vers l'extérieur, la membrane externe porte des lipopolysaccharides (*fig. 1-7, B*).

B. Organisation d'une bactérie photosynthétique : une cyanophycée

Les Cyanophycées, ou cyanobactéries, anciennement appelées « algues bleues », sont des Procaryotes photosynthétiques qui vivent dans des mares ou des eaux salées. Sur le plan évolutif elles ont un grand intérêt car on les trouve dans des sédiments de plus de 3 milliards d'années. Actuellement la masse des procaryotes photosynthétiques trouvés dans les océans fournit une grande partie de l'oxygène composant l'atmosphère terrestre.

L'organisation des Cyanophycées est globalement comparable à celle des bactéries non photosynthétiques (*fig. I-8*). La paroi est épaisse et souvent recouverte d'une couche de mucilage en contact avec le milieu aqueux environnant. Comme chez le colibacille le cytoplasme est riche en ribosomes et contient le nucléoïde. Ce qui différencie ces organismes de ceux précédemment décrits est la présence d'un réseau très développé de membranes internes formant des lamelles, les *thylakoïdes*, qui portent des pigments photosynthétiques dont la chlorophylle, et qui donnent aux Cyanophycées leur teinte bleu-vert. Les « algues

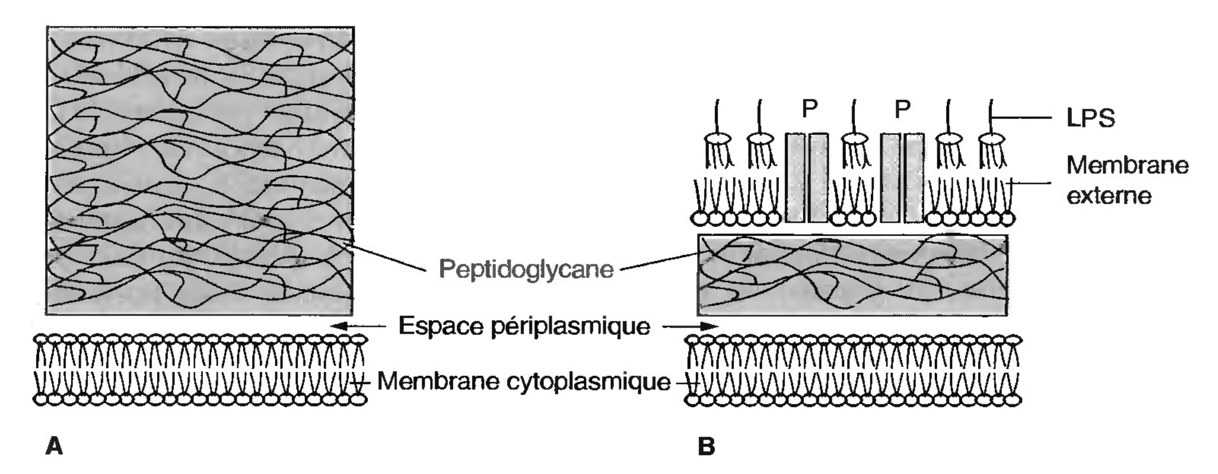


Fig. I-7 : La paroi des bactéries Gram + et Gram –.
A) Bactérie à Gram positif avec paroi de peptidoglycane épaisse ;
B) Bactérie à Gram négatif avec double membrane phospholipidique et paroi de peptidoglycane mince.
P, porine ou pore membranaire ; LPS, lipopolysaccharide.

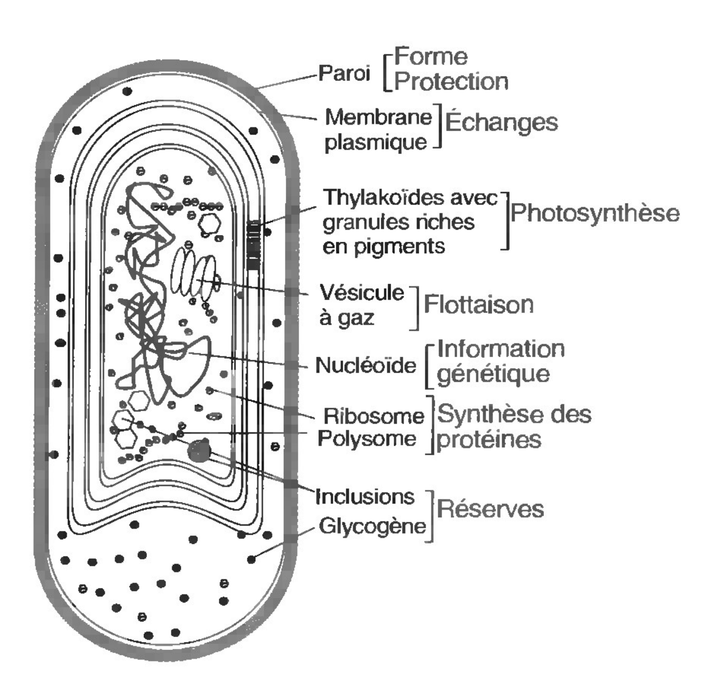


Fig. I-8: **Organisation d'une Cyanophycée.**
(D'après R. Stanier et G. Cohen-Bazire. Ann Rev Microbiol 1977.)

bleues » sont ainsi des *êtres autotrophes* capables de capter l'énergie lumineuse et de la transformer. Les glucides synthétisés sont stockés dans le cytoplasme sous forme de glycogène.

3.3. LE MODÈLE EUCARYOTE

Les Eucaryotes représentent la majorité des êtres vivants. Quoique très variés dans leur organisation générale, ils ont en commun des propriétés fondamentales, au moins à l'échelle cellulaire, qui vont être dégagées à partir de modèles de cellules idéales. Les Eucaryotes peuvent être rangés en deux groupes principaux :

– les **Eucaryotes unicellulaires,** dont les exemples les plus connus sont les algues unicellulaires, les levures, les paramécies ou les amibes ;

– les **Eucaryotes pluricellulaires**, de loin les plus nombreux, et qui sont formés de millions de milliards de cellules.

Nous décrirons ici deux cellules appartenant à des organismes pluricellulaires animaux ou végétaux. Ces cellules sont des cellules « théoriques » ne correspondant en fait à aucun modèle précis de différenciation et de fonctionnement.

A. Organisation d'une cellule animale

La cellule animale comprend *(fig. I-9)* :

– La **membrane plasmique**, assemblage de phospholipides et de protéines limitant la cellule. Les cellules animales étant le plus souvent associées en tissus, les membranes plasmiques des cellules voisines sont juxtaposées, ménageant entre elles un espace rempli de protéines qui constituent la **matrice extracellulaire**. Selon les tissus, les cellules voisines établissent des communications diverses, soit serrées, soit ouvertes : il s'agit des **jonctions cellulaires**.

– Le **noyau** occupe un volume important dans le cytoplasme. Il est séparé du cytosol par une enveloppe nucléaire ménageant des pores. Dans le noyau, siège du stockage et d'une partie de l'expression de l'information génétique, on peut reconnaître les territoires du **nucléole** et de la **chromatine,** assemblage d'ADN et de protéines plus ou moins pelotonnés. Chez les Eucaryotes, du côté interne de l'enveloppe nucléaire se reconnaît la **lamina nucléaire**, couche de protéines qui stabilise la membrane nucléaire et permet l'ancrage des chromosomes.

– Le cytoplasme des cellules animales est plus complexe que celui des Procaryotes. Un système de **membranes internes** se développe qui comprend : 1) le **réticulum endoplasmique** constituant un ensemble de cavités aplaties. C'est une portion du réticulum endoplasmique qui entoure le noyau et forme la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. Dans la cellule le réticulum endoplasmique peut être aussi associé à des polysomes : c'est le RER (ou réticulum endoplasmique rugueux) où se réalise la synthèse des protéines destinées à l'exportation ; 2) **l'appareil de Golgi**, comprenant un ou plusieurs dictyosomes, systèmes de saccules empilés qui contribuent au rassemblement, au stockage, au triage et à l'affinage des produits de sécrétion : 3) les **lysosomes**, vésicules closes qui consti-

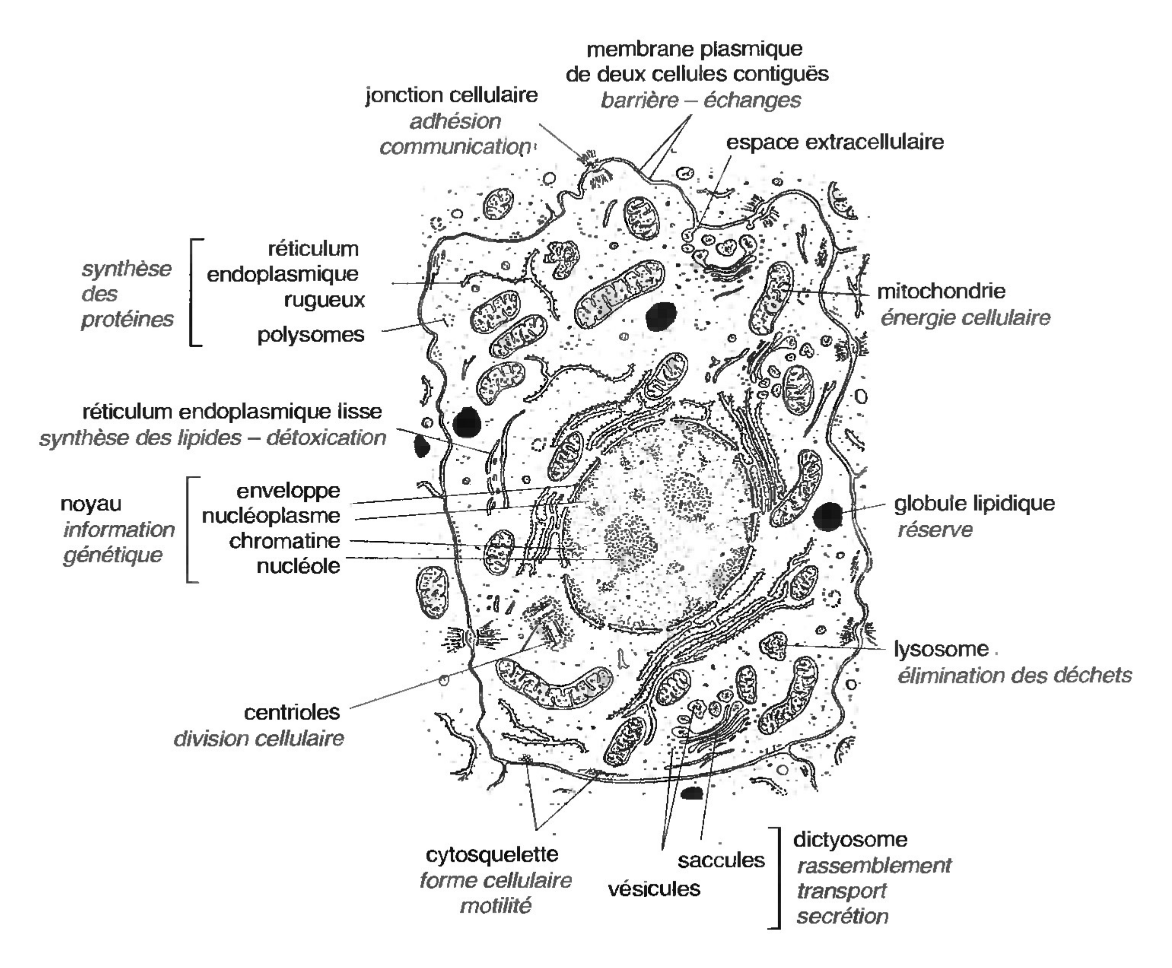


Fig. I-9 : Organisation d'une cellule animale.

tuent pour la cellule un centre de stockage des enzymes lytiques et un lieu permettant l'élimination des déchets ; 4) selon le type cellulaire et selon le moment de la différenciation on reconnaît dans la cellule des **vésicules de sécrétion** qui sont dirigées vers la surface cellulaire pour l'exportation, ou des **vésicules d'endocytose** qui permettent au contraire une internalisation de composés venus de l'extérieur et un recyclage des membranes en excès.

– Dans le cytoplasme se développe aussi un important **cytosquelette** constitué de différents types de protéines (microtubules, microfilaments et filaments intermédiaires), systèmes de cables qui jouent un rôle dans la motilité intracellulaire et éventuellement cellulaire. Au voisinage du noyau on reconnaît dans les cellules animales les **centrioles** impliqués dans la division cellulaire.

– Les **mitochondries,** organites clos, limités par une membrane externe contre laquelle est accolée une membrane interne. Les mitochondries contiennent toute la machinerie permettant la respiration cellulaire et la synthèse de l'ATP.

Au total, plusieurs points peuvent être soulignés qui illustrent les différences avec les cellules de Procaryotes :

– l'augmentation du *volume cellulaire*. Par rapport aux bactéries il peut être augmenté d'un facteur 100. L'anatomie générale d'une cellule animale peut être observée au microscope photonique. En revanche l'organisation subcellulaire ne peut être analysée qu'au microscope électronique (une mitochondrie a environ les mêmes dimensions que la bactérie précédemment décrite, voir les échelles respectives sur la *figure I-5*) ;

– la multiplication des organites et une augmentation considérable de la *surface membranaire*, ce qui permet une multiplication des

réactions chimiques. En particulier une *compartimentation* morphologique apparaît qui permet de séparer les fonctions chimiques et de les concentrer, facilitant ainsi leur réalisation quand la cellule est de grande taille;

– l'apparition d'un *cytosquelette* qui permet une répartition topographique et un guidage des mouvements dans un grand volume cellulaire.

B. Organisation d'une cellule végétale

Dans ses grandes lignes, l'architecture d'une cellule végétale est très semblable à celle d'une cellule animale, en particulier en ce qui concerne la membrane plasmique, l'organisation du noyau, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, les mitochondries *(fig. I-10)*. Les différences portent sur l'existence de trois compartiments propres:

– La **paroi cellulaire**, revêtement extracellulaire localisé au-delà de la membrane plasmique. La paroi est constituée de fibrilles de cellulose enrobées dans une matrice formée d'autres polysaccharides et de glycoprotéines. Elle constitue pour la cellule une charpente extérieure très structurée qui donne à la cellule sa forme et ses propriétés mécaniques. Dans cette paroi les communications intercellulaires sont assurées par des **plasmodesmes**.

– L'**appareil vacuolaire**, compartiment interne qui peut occuper jusqu'à 90 % du volume cellulaire. C'est un compartiment très riche en eau et en différents types de sub-

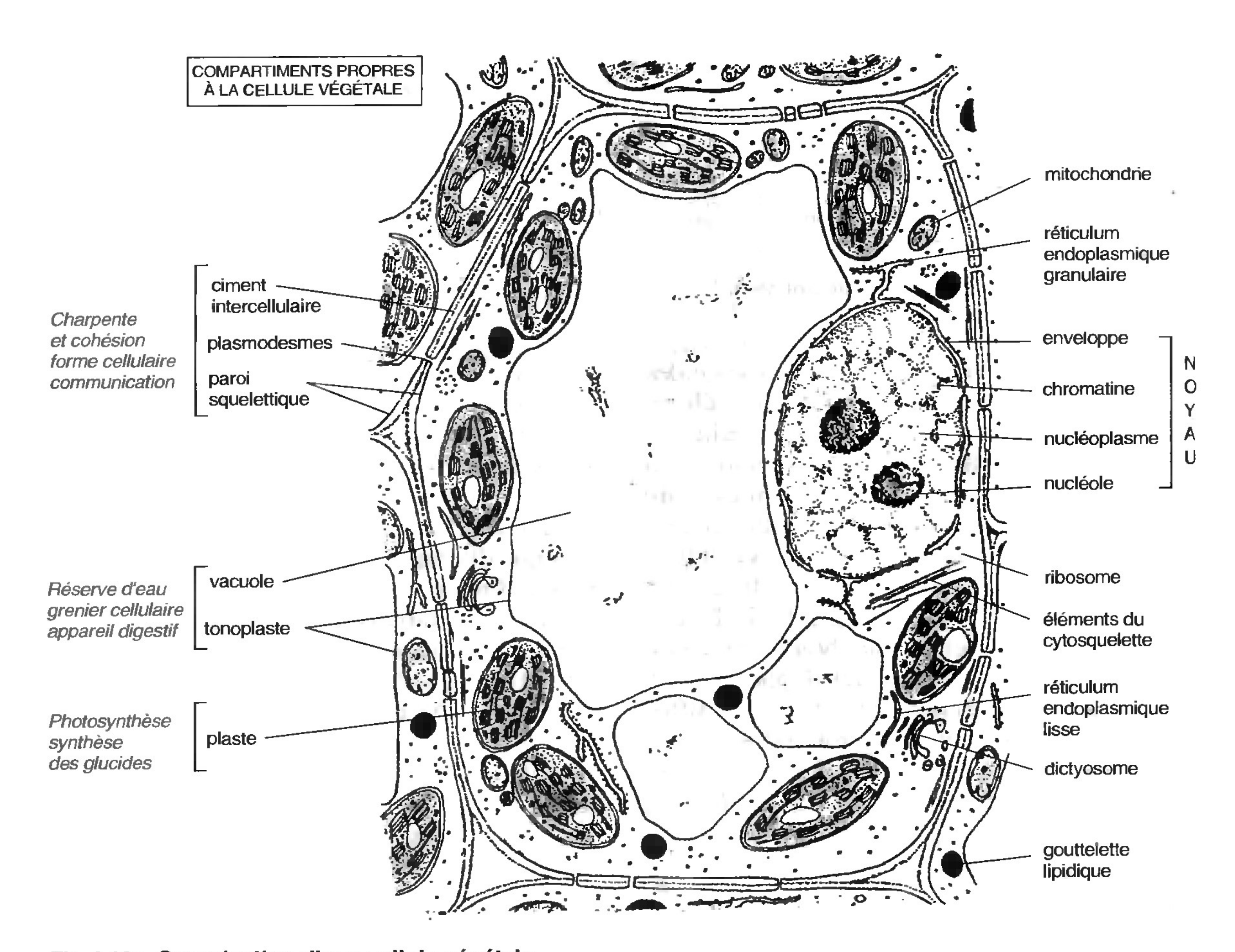


Fig. I-10: Organisation d'une cellule végétale.
(Adapté de D. ROBERT et J.C. ROLAND. Doin, 1989.)

stances dissoutes (réserves ou déchets). La vacuole peut être considérée à la fois comme le *grenier* de la cellule et le compartiment où s'effectuent la digestion *(estomac cellulaire)* et la détoxication cellulaire. La vacuole est limitée par une membrane, le tonoplaste.

– Les **plastes**, en particulier les **chloroplastes**, qui permettent à la cellule végétale la transformation de l'énergie lumineuse, la synthèse des glucides et la production d'oxygène dans le mécanisme de photosynthèse. Les plastes sont limités comme les mitochondries par une membrane externe doublée d'une membrane interne. D'autres plastes, riches en pigments divers, produisent par ailleurs les couleurs très vives de l'environnement végétal.

3.4. COMPARAISON DES ORGANISMES PROCARYOTES ET EUCARYOTES

L'analyse des différents exemples montre que, bien que toutes les fonctions cellulaires soient assurées chez les Procaryotes, ceux-ci présentent une organisation plus simple que les Eucaryotes. Une comparaison très simplifiée est proposée sur la *figure I-11*. On verra dans les chapitres suivants que d'autres différences importantes existent entre Procaryotes et Eucaryotes, notamment en ce qui concerne l'organisation et l'expression de l'information génétique (présence ou absence dans les gènes d'introns, c'est-à-dire de zones qui ne seront pas traduites, maturation ou non des transcrits).

Les cellules Procaryotes ont longtemps été considérées comme les plus proches des cellules ancestrales. Les données récentes suggèrent que la lignée eucaryote est beaucoup plus ancienne qu'on ne le pensait. Il est admis aussi que les mitochondries et les chloroplastes des Eucaryotes sont des descendants de cellules procaryotes primitives établies comme symbiotes internes d'une cellule anaérobie plus grande (voir chap. X). L'arbre phylogénétique simplifié proposé en *figure I-12* montre les relations entre les trois groupes principaux, Archébactéries, Eubactéries et Eucaryotes. Il révèle, en particulier, que les organismes les plus connus et les plus étudiés, animaux et plantes, ne représentent qu'une toute petite partie de l'univers du vivant.

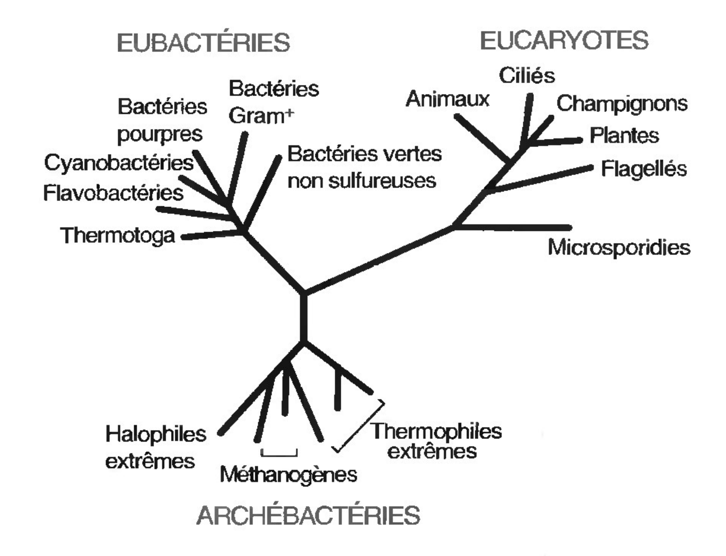


Fig. I-12 : Arbre simplifié du vivant.

	Procaryotes	Eucaryotes
Organismes	Bactéries, cyanophycées unicellulaires	Protistes, champignons, plantes, animaux habituellement pluricellulaires
Taille cellulaire	Petite taille, 1-10 µm de long	Grande taille, 10-100 µm de long
Information génétique	Nucléoïde bactérien, une molécule d'ADN circulaire (+ plasmides)	Noyau entouré d'une enveloppe, ADN + protéines (chromatine)
Synthèse des protéines	Polysomes	Polysomes
Gestion de l'énergie	Membrane plasmique	Mitochondries
Division	Scissiparité	Mitose
Cytoplasme	Pas de compartiments intracellulaires Pas de cytosquelette	Compartiments endomembranaires Cytosquelette

Fig. I-11 : Tableau comparatif simplifié de l'organisation des Procaryotes et des Eucaryotes.

3.5. SPÉCIALISATION CELLULAIRE : UNITÉ ET DIVERSITÉ EN BIOLOGIE

En termes de structure et de fonction, les cellules sont caractérisées à la fois par une grande unité et une grande diversité. Les chapitres suivants essaieront surtout de dégager les *caractères communs* qui peuvent expliquer le fonctionnement d'une cellule. Toutefois il faut se rappeler que les organismes, et plus particulièrement les organismes eucaryotes, sont constitués d'un nombre considérable de cellules qui sont différentes, tant par leur anatomie que par leur fonction. Quoique possédant théoriquement toute la même information génétique – celle de l'œuf fécondé – les cellules expriment en effet cette information héréditaire de façon différente. Un animal adulte contient par exemple 200 types différents de cellules. Elles se spécialisent et deviennent des *cellules différenciées*. Dans certains chapitres des types cellulaires précis seront donc choisis comme des modèles favorables pour étudier telle ou telle fonction cellulaire : cellules du pancréas pour les voies de sécrétion des glycoprotéines exportables, cellules sanguines pour la connaissance de l'architecture de la membrane plasmique par exemple.

4. LE CAS DES VIRUS

Avant de conclure cette introduction à la biologie cellulaire, la question reste posée de la place des virus. L'importance des virus n'est pas à démontrer. On sait qu'ils sont responsables de nombreuses maladies infectieuses plus ou moins graves (grippe, poliomyélite, sida, lésions des plantes) et qu'ils sont susceptibles de provoquer de nombreux cancers.

Historiquement les virus sont restés longtemps décrits comme des agents pathogènes dont il était difficile de donner une définition et dont il était même difficile de savoir si, à la limite, il s'agissait d'êtres vivants. Le critère retenu pour différencier les virus des bactéries – qui sont souvent aussi des agents pathogènes – fut longtemps un critère de taille. Les virus sont en effet très petits, leur taille est toujours inférieure à 0,3 µm (ils varient entre 10 et 300 nm), et ils ne sont jamais retenus par les filtres ultrafins arrêtant les bactéries.

La caractéristique importante des virus est qu'ils sont incapables d'une vie autonome. Ce sont des *parasites subcellulaires obligatoires*. Ils vivent aux dépens de cellules vivantes, appelées cellules hôtes, qui sont soit des bactéries, soit des cellules animales ou végétales.

L'organisation des virus est globalement assez simple dans la mesure où ils ne sont constitués que par un acide nucléique entouré et protégé par un revêtement plus ou moins complexe. On peut distinguer deux types de virus : 1) les virus dont l'acide nucléique est entouré seulement par une **capside**, c'est-à-dire une coque protéique dont l'arrangement géométrique est très défini ; 2) les virus qui, en plus de la capside, possèdent une **enveloppe** ayant plus ou moins la structure d'une membrane plasmique *(fig. I-13)*.

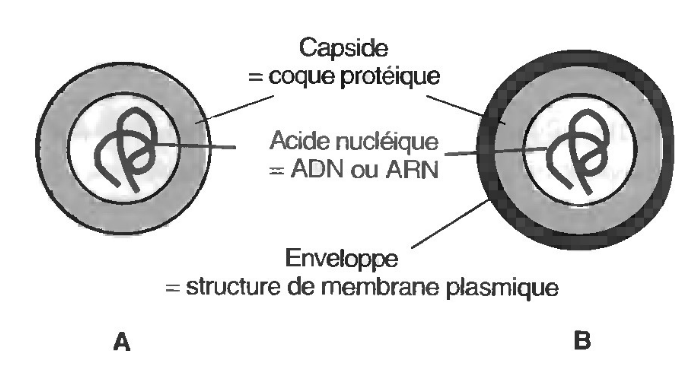


Fig. I-13 : Organisation des virus.
A) Virus à capside.
B) Virus à capside et enveloppe.

Posté par Boyaya

LES « ORGANISMES MODÈLES » POUR LES BIOLOGISTES

Depuis toujours les biologistes ont conduit leurs recherches en tentant de trouver des organismes leur permettant les observations et les expérimentations les plus efficaces et reproductibles. Dans l'histoire passée, les modèles d'expérimentation sont restés relativement nombreux et variés selon les communautés scientifiques. Depuis l'avènement du microscope électronique et surtout depuis le développement des techniques de génétique et de biologie moléculaire, la tendance a nettement changé et les biologistes recherchent actuellement des organismes dont le génome, relativement simple, est en cours d'identification et de clonage et qui deviennent progressivement des « organismes modèles » pour toute la communauté scientifique internationale. Nous citerons ici quelques modèles biologiques qui représentent les organismes les plus utilisés tant chez les Procaryotes que chez les Eucaryotes.

En ce qui concerne les Procaryotes, la bactérie sur laquelle ont eu lieu les recherches les plus intensives et qui est donc la mieux connue aux niveaux biochimique et génétique est le colibacille de l'intestin, *Escherichia coli*. C'est une bactérie qui se divise activement et rapidement (toutes les 20 minutes à 37 °C en conditions optimales), qui a peu d'exigences nutritives et qui permet d'innombrables expérimentations de biologie moléculaire, en particulier l'obtention de nombreux mutants et recombinants (voir p. 176). C'est à partir d'*E. coli* qu'ont été découverts les premiers gènes de régulation par l'équipe française de F. Jacob, J. Monod et A. Lwoff, ce qui a valu à ces chercheurs le prix Nobel en 1965 (voir p. 247).

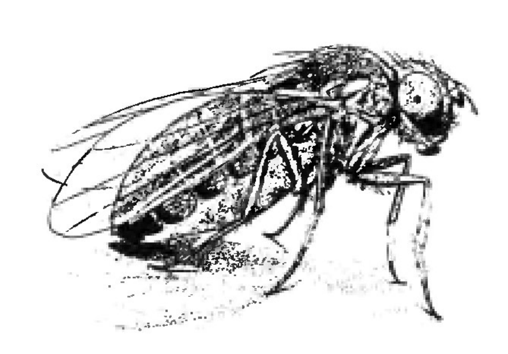
En ce qui concerne les organismes animaux eucaryotes, dès le début du siècle les travaux de génétique ont essentiellement porté sur la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*. Cet organisme est toujours largement utilisé. La drosophile est petite, se reproduit facilement et rapidement (l'œuf donne un adulte en 2 semaines), est facilement manipulable. Elle possède un génome relativement petit, de l'ordre de 10^8 paires de bases, ce qui permet une approche génétique facilitée. Actuellement la carte génétique de la drosophile est quasi complète et de nombreux mutants existent; la drosophile est l'organisme qui a permis d'améliorer notre compréhension sur la manière dont les gènes gouvernent le plan d'organisation corporelle. Un point particulièrement intéressant est que les gènes contrôlant le plan d'organisation du corps de la drosophile ont des équivalents chez les animaux supérieurs dont l'homme.

Un autre modèle largement utilisé est un ver nématode, *Caenorhabditis elegans*: c'est un organisme très simple sur le plan anatomique et dont le génome est là aussi très petit: un génome haploïde de 10^8 paires de bases, c'est-à-dire 20 fois plus important que celui de E. *coli*, semblable à celui de la drosophile et 30 fois moins important que le génome humain. La carte du génome de ce nématode est actuellement très avancée.

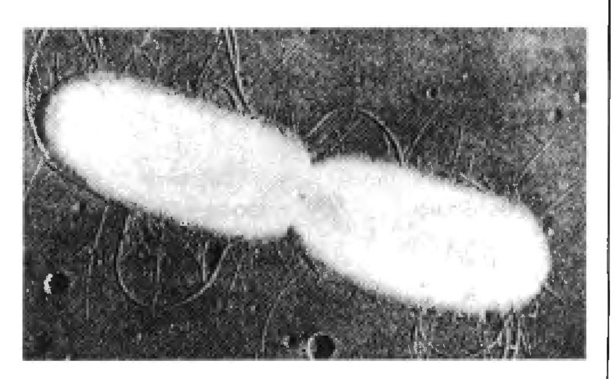
En ce qui concerne les organismes végétaux eucaryotes, c'est l'arabette commune, *Arabidopsis thaliana*, une mauvaise herbe de la famille du colza et du chou, qui est actuellement la plante modèle pour la communauté scientifique. La plante est petite, facilement cultivable, même en tube, et son cycle de développement est très court (de l'ordre de 6 à 8 semaines). L'arabette possède le plus petit génome connu chez les plantes, de l'ordre de 7.10^7 paires de bases. Un programme international est en cours pour effectuer le clonage de la totalité de son génome.



Arabette (hauteur 12 cm).
(Cliché H. HÖFTE.)



Drosophile (longueur 4 mm).



Colibacille (longueur 4 µm).
(D'après H. LECLERC et al. *Doin, 1983.)*

4.1. LES DIFFÉRENTS TYPES DE VIRUS

De nombreuses classifications ont été proposées pour les virus. Elles reposent sur le choix de différents critères.

A. Nature de l'acide nucléique

Les virus contiennent de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou de l'acide ribonucléique (ARN) ; *aucun virus ne contient les deux acides nucléiques à la fois.*

Dans le cas des virus à ADN, l'acide nucléique peut être monocaténaire (parvovirus) ou en double hélice (herpèsvirus, adénovirus). Les virus à ARN contiennent aussi de l'ARN mono ou bicaténaire. C'est parmi ces virus à ARN que l'on range le virus de la poliomyélite, le virus HIV *(Human Immunodeficiency Virus)* qui est responsable du syndrome d'immunodéficience (Sida).

B. Nature des protéines de la capside et mode d'assemblage des virus

Capside et acide nucléique viral sont associés en une structure très ordonnée, dont le mode de symétrie peut relever de deux modèles :

– la **symétrie hélicoïdale**. C'est le cas de la mosaïque du tabac, virus qui provoque des lésions irréversibles chez des plantes. Les éléments protéiques de la capside sont assemblés en hélice et organisent une gouttière où est installée la molécule d'ARN *(fig. I-14, A)*. Au microscope électronique le virus apparaît sous forme de bâtonnets de 17 nm de diamètre et 300 nm de long ;

– la **symétrie cubique**. C'est le cas des adénovirus ou du virus de l'herpès dont la nucléocapside présente l'aspect d'un icosaèdre régulier *(fig. I-14, B)*.

Les **bactériophages** (souvent appelés phages) représentent un type particulier de virus s'attaquant aux bactéries et dont la découverte précoce au début du siècle a permis des recherches nombreuses et très fructueuses. Le bactériophage possède une forme globale de têtard de 200 nm de long environ *(fig. I-14, C)*. La capside est organisée en un dérivé d'icosaèdre constituant la tête du virus. Cette tête est reliée à une queue constituant un cylindre creux dont la gaine est contractile. La fixation du phage sur la bactérie est rendue possible par l'existence d'un plateau portant des épines caudales. La particularité du bactériophage est la possibilité d'injecter son acide

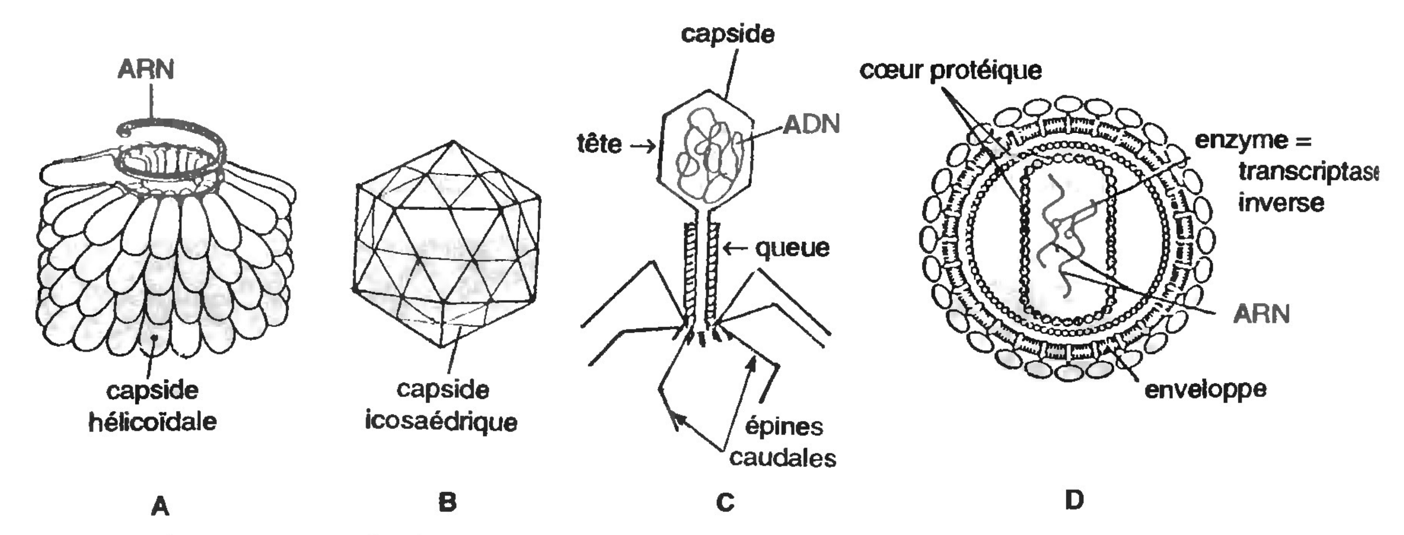


Fig. I-14 : Quelques types de virus.
A) Virus à capside hélicoïdale (exemple du virus de la mosaïque du tabac).
B) Virus à capside icosaédrique (exemple de l'adénovirus).
C) Bactériophage (coupe axiale).
D) Virus HIV.

nucléique dans la cellule- hôte par contraction de la gaine caudale et perforation de la paroi bactérienne.

Le virus HIV est un exemple de virus possédant une **enveloppe** *(fig. I-14, D)*. Cette enveloppe est constituée par une membrane empruntée à la cellule infectée (au moins pour ses composants lipidiques) et tapissée de glycoprotéines faisant saillie à l'extérieur du virus. À l'intérieur de cette enveloppe une coque protéique, le cœur, protège deux molécules d'ARN qui sont associées à plusieurs exemplaires d'une même enzyme, la *transcriptase inverse* (voir 4.3. p. 18).

4.2. CYCLES DE DÉVELOPPEMENT DES VIRUS

Le bactériophage peut être pris comme exemple pour comprendre les étapes du cycle de développement des virus. Deux modes d'infection sont possibles.

A. L'infection lytique

C'est le cas du phage T4. Le cycle lytique conduit à la mort des cellules. Les principales étapes de ce cycle sont résumées sur la *figure I-15*.

– **Adhésion**. C'est la phase initiale qui résulte de l'interaction entre des protéines de la capside et des molécules de surface de la paroi bactérienne. Il existe vraisemblablement des enzymes de pénétration qui aident à dégrader localement cette paroi.

– **Injection de l'ADN viral** dans la bactérie. *Seul l'ADN viral est injecté dans la cellule*, le reste du matériel viral constituant un « fantôme » qui demeure à l'extérieur. Lorsque l'ADN viral est injecté dans la cellule hôte il se circularise. Cette étape est importante puisqu'elle constitue le moment où l'information génétique du virus est apportée à la cellule bactérienne.

– **Synthèse des constituants viraux**. La pénétration de l'ADN viral modifie de façon

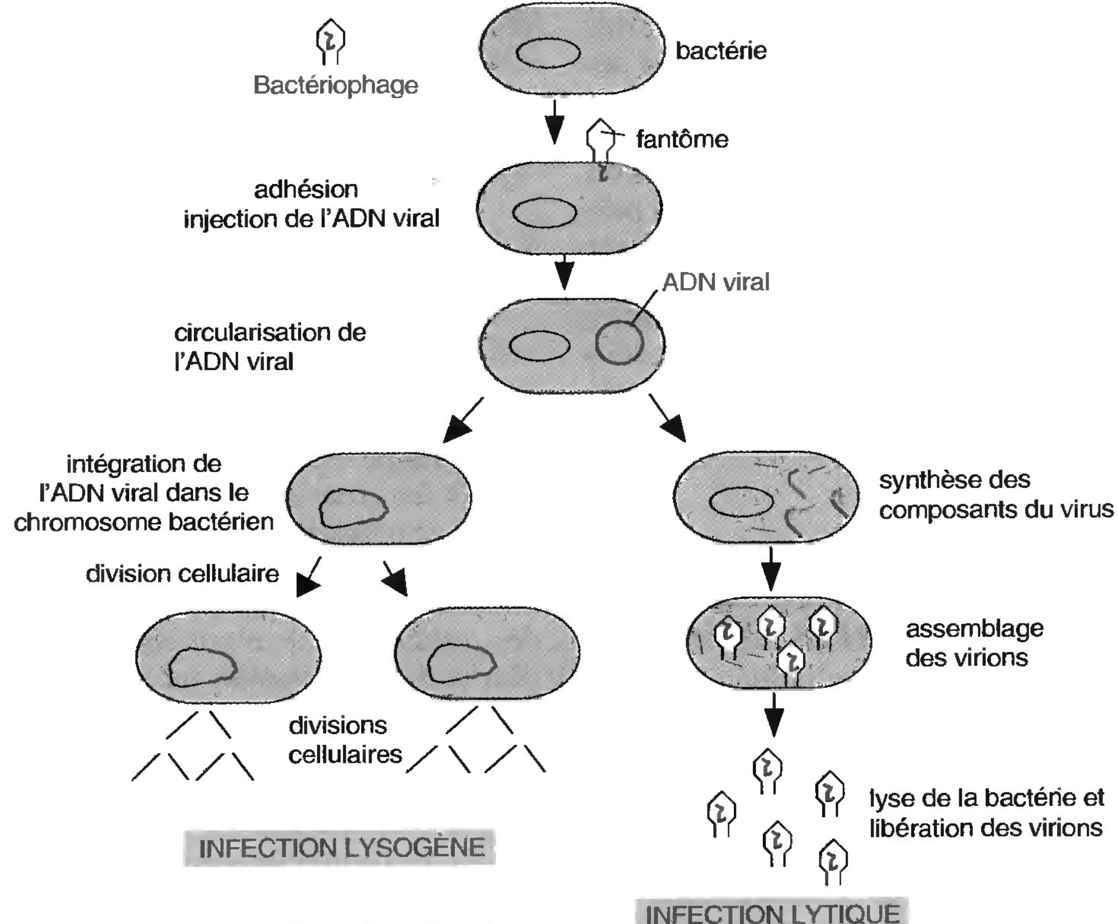


Fig. I-15 : **Cycle lytique et cycle lysogène des virus.**

brutale le fonctionnement cellulaire: au lieu de synthétiser ses propres matériaux (ADN + protéines bactériennes), la cellule hôte synthétise des protéines virales (protéines de la capside, enzymes). L'ADN viral est aussi synthétisé par réplication. Au terme de ce détournement total de la machinerie bactérienne, de nouvelles particules virales (appelées aussi virions) peuvent ainsi s'assembler (100 nouveaux bactériophages peuvent ainsi être assemblés au bout de 20 min).

– **Libération**. Les virus une fois assemblés sont libérés par lyse cellulaire. L'éclatement de la bactérie libère ainsi des centaines de copies du virus d'origine.

B. *L'infection lysogène*

C'est le cas du phage *lambda*. Après la fixation du phage et l'injection de l'ADN, les mécanismes décrits pour le cycle lytique peuvent intervenir. Il arrive plus rarement que l'ADN viral s'intègre au chromosome circulaire de l'hôte. Cela est rendu possible par des enzymes capables de couper l'ADN en des sites précis et d'autres capables de lier les extrémités libres.

L'ADN viral intégré, appelé un *provirus*, constitue à ce stade une forme d'infection masquée, latente. Les bactéries lysogènes porteuses de provirus peuvent alors se diviser normalement sans qu'un détournement de la machinerie bactérienne ait lieu. Sous l'effet d'un inducteur (par exemple l'action des UV) l'ADN viral est excisé du chromosome de l'hôte et les événements décrits dans le cycle lytique interviennent.

4.3. LES VOIES DE SYNTHÈSE DES COMPOSANTS DU VIRUS

Selon la nature des virus, c'est soit de l'ADN, soit de l'ARN qui pénètre dans la cellule hôte. Dans tous les cas, les virus ayant une quantité limitée d'informations dans leur génome doivent utiliser la machinerie et les voies métaboliques de l'hôte, mais les séquences d'événements qui permettent la survie du virus sont variables selon les différents virus et ne peuvent être analysées dans le détail ici.

Le cas où l'ARN est porteur de l'information génétique du virus conduit à des situations multiples. Dans certains exemples, l'ARN du virus peut servir directement d'ARN messager et être lu par la machinerie cellulaire de l'hôte. Le cas des virus à ARN monocaténaire est particulièrement intéressant. Ces virus sont connus sous le nom de **rétrovirus** parce que c'est leur ARN qui détient l'information génétique et que, par conséquent, le processus habituel de transcription de l'ADN en ARN est inversé. Pour ces virus, c'est une enzyme, la **transcriptase inverse**, présente dans le virus qui permet la transcription de l'ARN en ADN monocaténaire puis bicaténaire: le sens habituel du flux d'information est inversé. L'ADN soit s'intègre temporairement au génome de l'hôte, soit est dupliqué puis transcrit selon les voies habituelles, permettant ainsi l'assemblage du virus. Cette propriété de transcription inverse découverte chez les virus est très utilisée actuellement par les biologistes moléculaires, par exemple lors de la synthèse d'ADN complémentaire (voir p. 220).

4.4. LES VIRUS : ORGANISMES VIVANTS ?

En dehors de leurs cellules hôtes les virus sont *complètement inertes et métaboliquement inactifs*. On peut les isoler et même les cristalliser comme un véritable composé chimique. En fait ***les virus apparaissent comme des éléments génétiques mobiles situés à la limite du moléculaire et du vivant***. Ces formes d'organisation ne peuvent être considérées comme des cellules car ils n'ont aucun des caractères décrits dans le chapitre précédent (limites cellulaires, autonomie possible, faculté de gérer l'énergie...). La question ultime est de savoir s'il s'agit d'une forme primitive de vie. Mais il est peu probable que les virus aient précédé les premières formes de vie dans la mesure où ils ne peuvent se reproduire sans l'aide des cellules vivantes qu'ils parasitent.

CHAPITRE II

Composition chimique de la matière vivante

1. ANALYSE ÉLÉMENTAIRE

Tous les éléments entrant dans la constitution de la croûte terrestre ne sont pas présents dans les cellules : 27 seulement sont considérés comme essentiels à la vie

On peut comparer *(tab. II-1)* la composition en éléments minéraux (données pondérales) d'organismes vivants (cellules de Mammifères, cellules de blé) à celle du monde inerte (lithosphère, hydrosphère, atmosphère).

L'analyse de ce tableau, et du graphique qui l'accompagne *(fig. II-1)*, permet de dégager deux notions importantes :

• Il existe une sélectivité du choix des matériaux utilisés par les organismes vivants. Certains, peu abondants dans le milieu environnant, sont par contre des constituants fondamentaux des cellules (carbone, hydrogène par exemple) alors que d'autres, dont la teneur est importante dans la croûte terrestre, ne figurent qu'à l'état de traces dans les organismes (silicium par exemple). Cette sélectivité dans le prélèvement et le maintien de ce déséquilibre des concentrations impliquent **un contrôle strict des échanges** entre la cellule et le milieu ; **ce contrôle est situé au niveau de la membrane plasmique** ; nous en verrons quelques exemples en étudiant cette structure.

• Les teneurs sont peu différentes chez les animaux et chez les végétaux, ce qui témoigne de **l'unité du monde vivant**.

Ces données pondérales, si intéressantes qu'elles soient, doivent être complétées par celles du nombre d'atomes de chaque élément entrant dans la constitution de la matière vivante. Dans une cellule de mammifère par

TABLEAU II-1
Composition en éléments minéraux

	Monde inerte	Cellule de mammifère	Cellule de blé
Carbone	0,18 %	19,37 %	24 %
Azote	0,03 %	5,14 %	0,80 %
Hydrogène	0,95 %	9,31 %	8,50 %
Oxygène	48.00 %	62,00 %	64,00 %
Silicium	28.00 %	0,04 %	0,65 %
Sodium	2,40 %	0,05 %	0,05 %

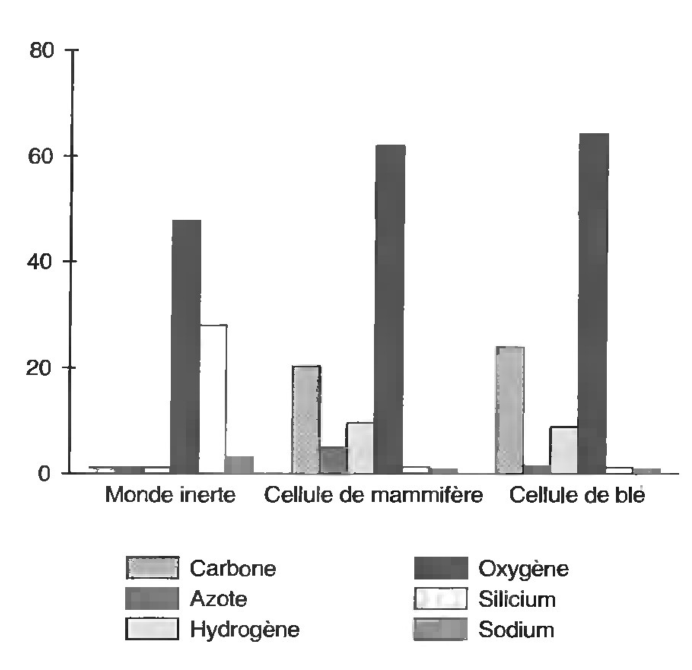


Fig. II-1 : Représentation graphique des teneurs en carbone, azote, hydrogène, oxygène et silicium dans le monde vivant et dans le monde inerte.

exemple, on trouve en moyenne pour 100 atomes : 9 de carbone, 1,4 d'azote, 62 d'hydrogène et 25 d'oxygène. ***97,4 % de la matière vivante sont donc formés à partir de 4 éléments*** *(fig. II-2)*.

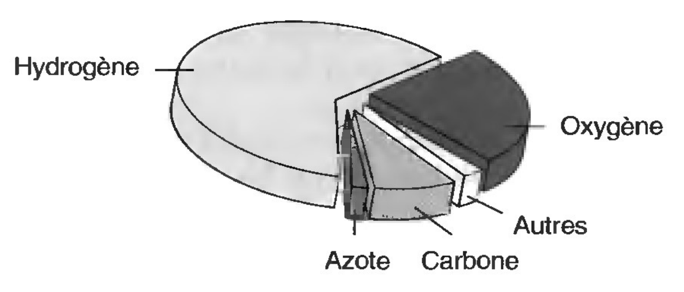


Fig. II-2 : Importance relative des principaux constituants de la matière vivante.

En fait, on doit distinguer, parmi les éléments constituant les êtres vivants, deux groupes. Ceux qui jouent un rôle plastique, construisant l'organisme, qui représentent 99 % des constituants cellulaires : ce sont les **éléments majeurs** ou **macroéléments** (C, H, O, N, S, P, Cl, Na, K, Ca, Mg). Ceux qui, bien que toujours présents, figurent en très faible quantité : ce sont les **oligoéléments** jouant un rôle essentiellement catalytique.

Deux éléments sont particulièrement abondants dans la constitution de la cellule, ce sont l'oxygène et l'hydrogène. La raison doit en être cherchée, en partie tout au moins, dans la très importante proportion d'eau contenue dans les êtres vivants.

2. L'EAU

2.1. TENEUR EN EAU DES ORGANISMES

La teneur en eau est très variable : 95 % dans le protoplasme des méduses mais seulement 10 à 20 % dans celui des graines.

En règle générale, l'eau est plus abondante chez les végétaux (80 % en moyenne), dont les cellules possèdent des vacuoles souvent importantes, que chez les animaux supérieurs (autour de 65 %).

À l'intérieur d'un organisme la quantité d'eau varie d'un tissu à l'autre : chez un Mammifère, par exemple, elle constitue 70 % du foie mais seulement 22 % du squelette.

La valeur moyenne peut être située autour de 70 %. C'est une forte teneur qui, d'une part, témoigne de l'origine marine des organismes et, d'autre part, confère à l'eau un rôle biologique important. Celui-ci est dû aux remarquables propriétés de cette molécule.

2.2. STRUCTURE DE LA MOLÉCULE D'EAU

L'eau est constituée par un atome d'oxygène et deux atomes d'hydrogène : sa formule est donc H_2O.

L'atome d'oxygène a une couche périphérique insaturée à 6 électrons ; l'atome d'hydrogène en possède un seul. L'oxygène met en commun ses électrons avec ceux de deux atomes d'hydrogène ; sa couche périphérique est saturée ; il n'y a plus alors d'orbitales atomiques pour les électrons de liaisons mais des orbitales moléculaires.

Les deux liaisons H:O établies sont donc deux liaisons covalentes où l'orientation des orbitales moléculaires n'est pas quelconque : *la forme de la molécule d'eau est celle d'un triangle isocèle* où les deux liaisons O-H forment un angle de 104° 30' *(fig. II-3)*.

Sur ces orbitales moléculaires, les probabilités de situation des électrons de liaison autour des atomes d'oxygène et d'hydrogène entrant dans la constitution de la molécule ne sont pas quelconques.

En effet, l'atome d'oxygène, plus volumineux, plus électronégatif que l'atome d'hydrogène, attire plus les électrons de liaison ; ils seront plus proches de son noyau et resteront donc plus longtemps autour de lui. *Il y a dès lors constitution de pôles négatifs.* Comme les atomes d'hydrogène ne comportent chacun qu'un électron, que celui-ci est engagé dans la liaison et donc retenu plus longtemps par l'oxygène, *il y a formation de pôles positifs.* **Chaque liaison est polaire**.

La molécule d'eau, H_2O, est dans son ensemble électriquement neutre mais la polarisation des liaisons fait apparaître des charges partielles + et –, figurées δ^+ et δ^- ; celles-ci sont inégalement réparties : **la molécule d'eau possède un moment électrique dipolaire**.

2.3. ORGANISATION TRIDIMENSIONNELLE

Ces charges étant faibles, le champ créé n'a d'effet qu'à proximité de la molécule ; cependant, comme les charges sont de signes opposés, il s'établit des forces électrostatiques entre les positives, δ^+, et les négatives, δ^- : **il y a interaction entre molécules lorsque celles-ci sont suffisamment proches** *(fig. II-4)*.

Ces liaisons s'établissent donc entre un atome d'hydrogène *engagé dans une liaison covalente*, chargé positivement, et un atome d'oxygène, *lui-même engagé dans une liaison covalente*, chargé négativement. Cette liaison est dite **liaison hydrogène**, la **liaison H.** Elle est symbolisée par une suite de tirets ou de points. C'est une liaison faible qui nécessite peu d'énergie pour être rompue, c'est l'énergie de liaison. À titre de comparaison, pour obtenir la rupture de cette liaison H entre molécules d'eau, il faut environ vingt fois moins d'énergie que pour rompre la liaison covalente O-H.

Étant donné la répartition des charges, δ^+ et δ^-, chaque molécule d'eau peut en principe établir 4 liaisons hydrogène avec les molécules voisines. C'est cette situation qui est réalisée dans les cristaux de glace : les molécules sont alors associées en un réseau cristallin régulier *(fig. II-5)*.

Les liaisons qui maintiennent ce réseau sont des liaisons hydrogène, c'est-à-dire des liaisons faibles, et deux facteurs interviennent pour modifier l'agencement des molécules d'eau : 1) *ces liaisons ne possèdent pas toutes la même énergie* ; celle-ci est maximale

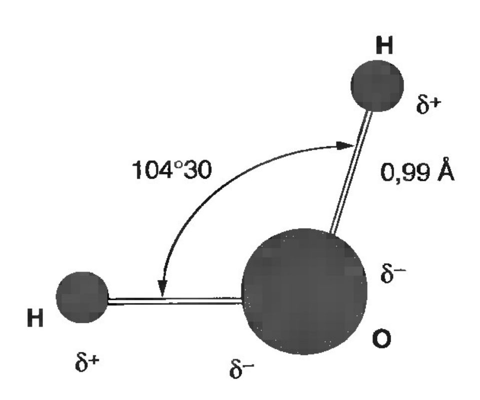


Fig. II-3 : Représentation schématique d'une molécule d'eau.

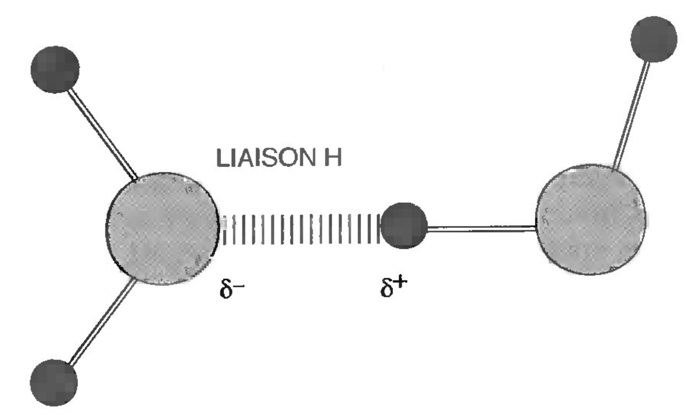


Fig. II-4 : Liaison H (hydrogène) entre deux molécules d'eau.

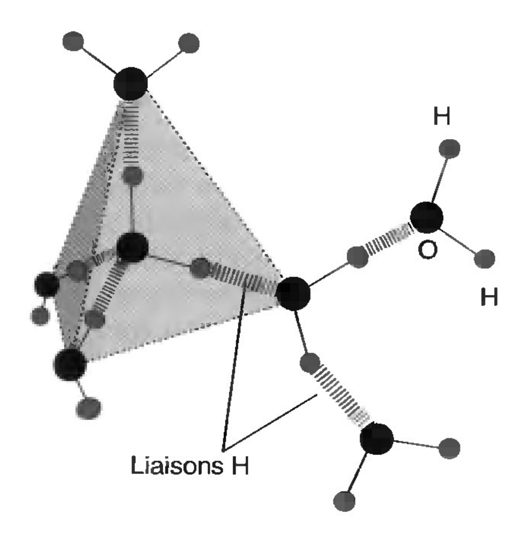


Fig. II-5 : Structure de la glace.
Lorsque les trois atomes, un hydrogène encadré par deux oxygènes, sont alignés, la liaison H est dans sa conformation la plus stable. Cette disposition, et l'angle formé par les liaisons covalentes entre l'oxygène et les atomes d'hydrogène, conduit à un arrangement tétraédrique.

lorsque les atomes O-H-O sont alignés mais le nombre de liaisons alors possibles est plus réduit ; 2) *l'agitation thermique des molécules provoque des collisions intermoléculaires susceptibles de rompre les liaisons hydrogène.*

Il s'ensuit que, à une température déterminée, une molécule d'eau est liée à un nombre plus ou moins important d'autres molécules. À 37 °C on a calculé que ce nombre est 3,4. Cela résulte, d'une part, de la diversité des forces de liaisons H impliquées (dépendant elles-mêmes de l'alignement plus ou moins précis des atomes) et, d'autre part, du fait que l'agitation thermique provoque des chocs suffisants pour les rompre. Mais ces liaisons peuvent se rétablir immédiatement entre molécules d'eau différentes. La durée de vie moyenne d'une liaison H entre molécules d'eau est à température ordinaire de 1.10^{-9} s. Les liaisons se rompant et se reformant sans cesse, l'eau est un liquide très fluide qui, à un instant donné, est constitué d'un ensemble de molécules isolées (H_2O), de dimères ($[H_2O]_2$) ou de polymères ($[H_2O]_n$) ; *la proportion relative de ces différents constituants du mélange dépend du nombre et de l'intensité des chocs intermoléculaires dus à l'agitation thermique.* Lorsque celle-ci est trop importante, la distance entre les molécules est trop élevée pour que les liaisons H puissent s'établir ; l'eau est à l'état gazeux.

2.4. PROPRIÉTÉS DE L'EAU

A. Dissociation ionique

Un nombre réduit de molécules d'eau se trouve dissocié :

$$H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$$

Ce mode d'expression est pratique mais il n'existe probablement qu'un nombre très réduit de protons libres. On devrait alors écrire :

$$2\,H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^-$$

L'eau pure est faiblement ionisée ; à 25 °C les concentrations sont seulement de 1.10^{-7} ions H^+ et 1.10^{-7} ions OH^-.

La concentration en ions H^+ s'exprime en unités pH. Le pH correspond au $\log_{10}$ de l'inverse de la concentration en ions H^+, $[H^+]$:

$$pH = \log_{10}\left(\frac{1}{[H^+]}\right)$$

$$\text{à } 25\,°C,\ pH = \log_{10}\left(\frac{1}{10^{-7}}\right) = 7{,}00$$

Comme dans l'eau pure, à 25 °C, il y a autant d'ions H^+ que d'ions OH^-, le pH est neutre.

Certaines molécules organiques se dissocient dans l'eau ; *les unes, donneuses de protons sont les acides :*

$$CH_3\text{-}C(=O)OH \longrightarrow CH_3\text{-}C(=O)O^- + H^+$$

Acide acétique

les autres, acceptant les protons du milieu, sont des bases :

$$NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$$

Ammoniac

Elles modifient la concentration en ions H^+ et donc le pH des solutions.

La solution aqueuse intracellulaire contient de nombreux ions organiques et inorganiques et le pH cytoplasmique est donc différent de celui de l'eau pure. Il est généralement supérieur à la neutralité de quelques dixièmes d'unité (pH 7,3 - 7,4). Il peut varier selon les cellules mais reste le plus souvent peu éloigné de pH 7,00. Il diffère également, dans une même cellule, d'un compartiment à l'autre (vacuole, mitochondrie). Toutefois, dans une cellule ou un compartiment donné, il reste généralement constant, ce qui implique *un mécanisme de régulation très précis* pour les concentrations ioniques.

B. L'eau solvant biologique

L'introduction dans l'eau d'un sel, un cristal de chlorure de sodium par exemple constitué par un réseau d'ions sodium, Na^+, et chlore, Cl^-, maintenus associés par des liaisons électrostatiques, rompt les liaisons H établies entre les molécules d'eau. De nouvelles liaisons s'établissent alors *(fig. II-6)* ; le chlorure de sodium est dissocié et les ions se dispersent dans l'eau: le sel est dissous; le sel est alors appelé le *soluté* et l'eau dans laquelle il est dispersé le *solvant*.

De nombreuses molécules peuvent ainsi rompre les liaisons hydrogène établies entre les molécules d'eau. Ce sont:

– soit des ions ou des substances ionisées comme le chlorure de sodium;

– soit des molécules susceptibles d'établir des liaisons H avec l'eau, *c'est-à-dire des molécules possédant des atomes engagés dans des liaisons covalentes qui, à l'instar de l'hydrogène et de l'oxygène de l'eau, sont porteuses d'une charge électrique positive (H) ou négative (O, N).*

Il existe alors une compétition entre ces atomes et ceux de l'eau pour l'établissement des liaisons H. Les molécules possédant ce type d'atomes peuvent alors se disperser dans l'eau avec laquelle elles établissent des liaisons H leur permettant de s'intégrer au réseau; ce sont les **substances hydrophiles ou polaires**.

La polarité des molécules reste souvent le fait de certains groupements chimiques particuliers où les atomes d'hydrogène et d'oxygène, engagés dans les liaisons covalentes, sont chargés. Ce sont par exemple les groupements **hydroxyles**, *R-OH* *, les **acides**, *R-COOH*, les **aldéhydes**, *R-CHO*, les **cétones**, *R-C=O*, les **amines**, *R-*NH_2 *(tab. II.2)*. Plus ces groupements sont nombreux, plus facile est la dissolution de la molécule; les sucres, qui contiennent, comme nous le verrons, de très nombreux groupements hydroxyles, sont des substances très hydrosolubles.

D'autres molécules qui ne contiennent aucun atome possédant une charge électrique *ne peuvent s'intégrer au réseau*; elles ont alors tendance à se réunir, s'exclure du réseau aqueux, diminuant ainsi les perturbations qu'elles y apportaient; ce sont des **molécules hydrophobes** contenant de nombreux **groupements apolaires** comme par exemple R-CH_3. Les huiles et les graisses, formées par de longues molécules résultant de l'enchaînement de nombreux groupements CH_3, sont l'un des meilleurs exemples de molécule apolaire *(fig. II-7)*.

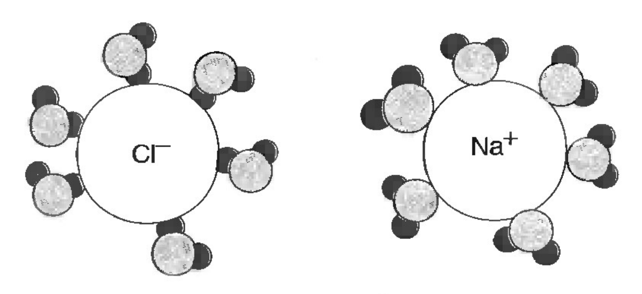


Fig. II-6: **Orientation des molécules d'eau par rapport aux ions, par exemple au chlore et au sodium.** En raison de leur tendance à attirer et maintenir les molécules d'eau, les ions en solution aqueuse sont partiellement protégés de l'environnement, notamment des autres ions. En conséquence les interactions ioniques dans les cellules sont relativement faibles, beaucoup plus faibles que celles rencontrées dans un cristal.

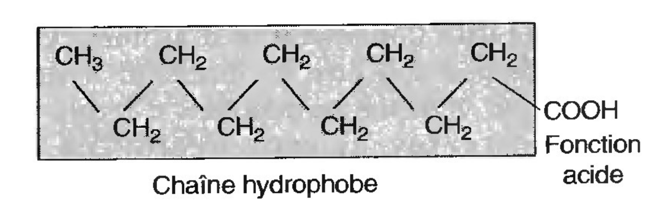


Fig. II-7: **Exemple de molécule apolaire: la chaîne hydrophobe des acides gras (encadrée); cette molécule possède toutefois une extrémité polaire, la fonction acide.**

* R représente la molécule ou la fraction de molécule liée au groupement.

TABLEAU II-2

Principales fonctions rencontrées dans les molécules biologiques et intervenant dans les mécanismes biochimiques

Fonctions alcool

H *Groupe hydroxyle (OH)*

— C — OH

H

Fonction alcool primaire (CH_2OH)

Groupe hydroxyle (OH)

H — C — OH

Fonction alcool secondaire (CHOH)

Fonction aldéhyde (CHO)

Groupe carbonyle (C = O)

— C(=O)H

Fonction cétone

Groupe carbonyle (C = O)

C = O

Fonction acide

Groupe carboxyle (COOH)

— C(=O)OH

Fonction amine

— C — NH_2 + H^+ → — C — NH_2 — H^+

Fonction amine ionisée

Phosphate (Pi)

Acide phosphorique ionisé

$^-$O — P(=O)(O$^-$) — O$^-$

Le groupe hydroxyle des fonctions alcool est souvent appelé glycol dans les molécules glucidiques (voir chap. V, 1re partie).

C. *État de l'eau dans la cellule*

La cellule est constituée par l'association de très nombreuses *macromolécules*, molécules de très grande taille, formées par l'association d'une quantité considérable d'atomes. Ces molécules peuvent être entièrement hydrophiles et par là même susceptibles d'établir de très nombreuses liaisons hydrogène ou ioniques, totalement hydrophobes comme certains dérivés lipidiques, ou constituées par la juxtaposition de zones hydrophiles et de zones hydrophobes.

Autour de toutes ces macromolécules, les molécules d'eau s'organisent *(fig. II-8)*. Elles s'unissent aux groupes chargés et polaires, établissant des liaisons électrostatiques, et forment une couche continue de molécules orientées ; elles s'associent entre elles en réseaux polygonaux s'organisant autour des zones hydrophobes dont ils sont bien séparés. Dans tous les cas, il se forme une couche **monomoléculaire** d'eau, très structurée : c'est ***l'eau liée***. Cette couche a des propriétés très particulières ; ainsi, l'agencement très précis des molécules lui confère des caractères comparables à ceux de la glace (faible mobilité, difficilement sublimable, exclusion de nombreux solutés...) ; de même, l'étroite association des molécules dans l'eau liée leur permet d'échanger aisément des protons ; lorsque cet échange est orienté, il peut s'établir *un courant protonique* susceptible d'intervenir dans certaines cellules comme moyen de transmission d'une information *(fig. II-9)*.

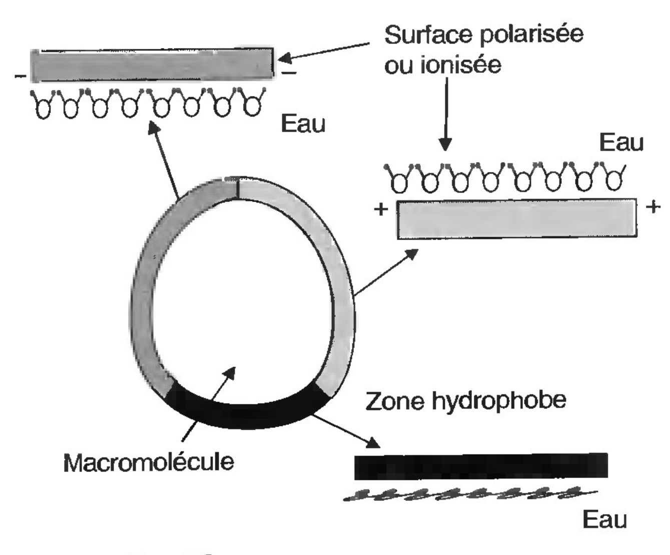


Fig. II-8 : Eau liée.
L'eau est associée aux groupements chimiques exposés à la surface des macromolécules, par exemple des protéines, par des liaisons faibles de nature électrostatique (hydrogène, ionique) lorsque la molécule est polaire ou chargée. Lorsque les radicaux exposés sont hydrophobes, les molécules d'eau associées s'organisent de telle sorte qu'elles excluent la macromolécule, n'établissant pas de liaisons avec elle. Dans tous les cas, elles forment une couche très stable qui nécessite beaucoup d'énergie pour être désorganisée.
(D'après P. Mentré, 1992.)

$$H^+ \quad H_2O \cdots H_2O \cdots H_2O$$

Fig. II-9 : Transfert de protons entre molécules d'eau.

À l'extérieur de cette couche d'eau liée, mais à proximité immédiate, le mouvement des molécules d'eau est légèrement perturbé en raison de la stabilité de la couche péri-macromoléculaire. Cela n'a pas d'importance lorsque les macromolécules sont très dispersées puisqu'elles diffusent aisément ; par contre, lorsque les macromolécules sont très nombreuses dans un volume réduit (matrice mitochondriale, stroma plastidial...), leurs déplacements peuvent être freinés par l'absence de mobilité des rares molécules d'eau qui les séparent ; *une relative stabilité des macromolécules les unes par rapport aux autres peut ainsi s'installer et jouer un rôle non négligeable dans le déroulement des réactions chimiques intracellulaires.*

D. L'eau, milieu thermiquement tamponné

En raison de la multiplicité des liaisons H intermoléculaires intervenant dans sa constitution, l'eau présente une grande cohésion moléculaire. Pour rompre ces liaisons et accroître l'agitation moléculaire qui élèvera la température, il est nécessaire de fournir une grande quantité d'énergie. Ainsi pour élever de 1 °C la température d'un litre d'eau, il est nécessaire de fournir 1000 calories et pour évaporer, c'est-à-dire faire passer à l'état gazeux, 1 gramme d'eau à 37 °C, il faut 575 calories.

La comparaison de ces deux valeurs est intéressante, comme le montre l'exemple suivant. Si un organisme reçoit une quantité d'énergie importante, un vacancier sur une plage au mois d'août par exemple, sa température va augmenter rapidement ce qui risque d'être particulièrement dangereux. L'évaporation d'une faible quantité d'eau, deux grammes, lui permettra alors de maintenir sa température constante pour un coût relativement faible.

E. L'eau, élément intervenant dans les réactions biologiques

L'eau participe à de nombreuses réactions chimiques dans la cellule, ce que l'on peut illustrer par quelques exemples.

De nombreuses molécules sont dégradées dans le cytoplasme par addition d'eau, ce sont des **hydrolyses** :

$$\underset{\text{Amidon}}{(C_6H_{10}O_5)_n} + \underset{\text{Eau}}{n\,H_2O} \rightarrow \underset{\text{Glucose}}{n\,C_6H_{12}O_6}$$

$$H_2N-CH(CH_3)-C(=O)-\boxed{OH} + \boxed{H}-N(H)-CH_2-COOH \rightarrow H_2N-CH(CH_3)-C(=O)-CH(H)-COOH + H_2O$$

Inversement d'autres molécules sont synthétisées avec élimination d'eau.

L'eau intervient également dans des processus plus complexes comme la **photosynthèse** où, servant de donneur de protons (H^+) et donneur d'électrons (e^-), elle permet la réduction du dioxyde de carbone (CO_2), la formation des glucides et la libération d'oxygène.

Nous aurons l'occasion, au cours des prochains chapitres, d'en voir de nombreux autres exemples.

3. LES SELS MINÉRAUX

Ils sont fort nombreux et se rencontrent sous deux formes :

• Immobilisés dans les squelettes et coquilles chez les animaux, la paroi chez les végétaux ; le calcium, le plus souvent sous la forme de carbonate ou de phosphate, et le silicium, sont les plus fréquents. Situés à l'extérieur de la cellule, ils ne nous intéresseront pas directement en biologie cellulaire.

• En solution, ils sont alors dissociés en ions, cations chargés positivement se déplaçant vers la cathode lorsqu'ils sont placés dans un champ électrique (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}), anions chargés négativement se dirigeant vers l'anode (Cl^-, SO_4^{2-}, PO_3^{2-}, NO_3^-, PO_4^{3-}...). Ils jouent un rôle considérable en biologie cellulaire : nous en verrons de nombreux exemples. Leur concentration dans le cytoplasme d'une cellule donnée est le plus souvent constante, ce qui suppose des mécanismes de régulation très précis.

4. LES ESPÈCES ORGANIQUES ET LES PROPRIÉTÉS DU CARBONE

L'atome de carbone est de petite taille et possède une couche électronique externe à 4 électrons seulement ; pour la compléter il peut échanger ces électrons avec d'autres atomes. Ces derniers peuvent être très divers *(tab. II-3)*, ce peut être notamment un autre atome de carbone.

Cette possibilité d'établir des liaisons entre carbones est particulièrement intéressante car *elle permet la formation de très longues molécules* où les liaisons entre carbones forment un ***squelette moléculaire*** *(tab. II-4)* qui peut être linéaire, ramifié ou cyclique.

La forme de ces molécules est conditionnée par celle de l'atome de carbone. Les 4 valences simples de l'atome présentent un arrangement tétraédrique avec un angle de 109°5 entre chacune d'entre elles. On parle de **carbone tétraédrique** pour indiquer que les 4 valences sont orientées vers les sommets d'un tétraèdre régulier dont l'atome occuperait le centre *(fig. II-10)*; il s'agit d'une construction géométrique virtuelle pour disposer les valences.

Les molécules constituées par un squelette carboné auront donc une structure tridimensionnelle complexe. L'agencement dans l'espace est très varié et cette diversité des formes est d'une importance considérable en biochimie puisqu'elle est à la base des *reconnaissances intermoléculaires* (réactions enzymatiques, formation du complexe antigène-anticorps...).

Cette forme de la molécule ne dépend cependant pas uniquement de l'ordre et de la nature des enchaînements. En effet entre **deux**

TABLEAU II-3
Diversité des possibilités de liaison du carbone

Les liaisons avec un atome d'hydrogène, un atome d'oxygène, un atome d'azote et un autre atome de carbone ont été représentées dans ce tableau. Les électrons de ces atomes ont été symbolisés différemment, ceux du carbone l'ont été par un cercle noir plein.

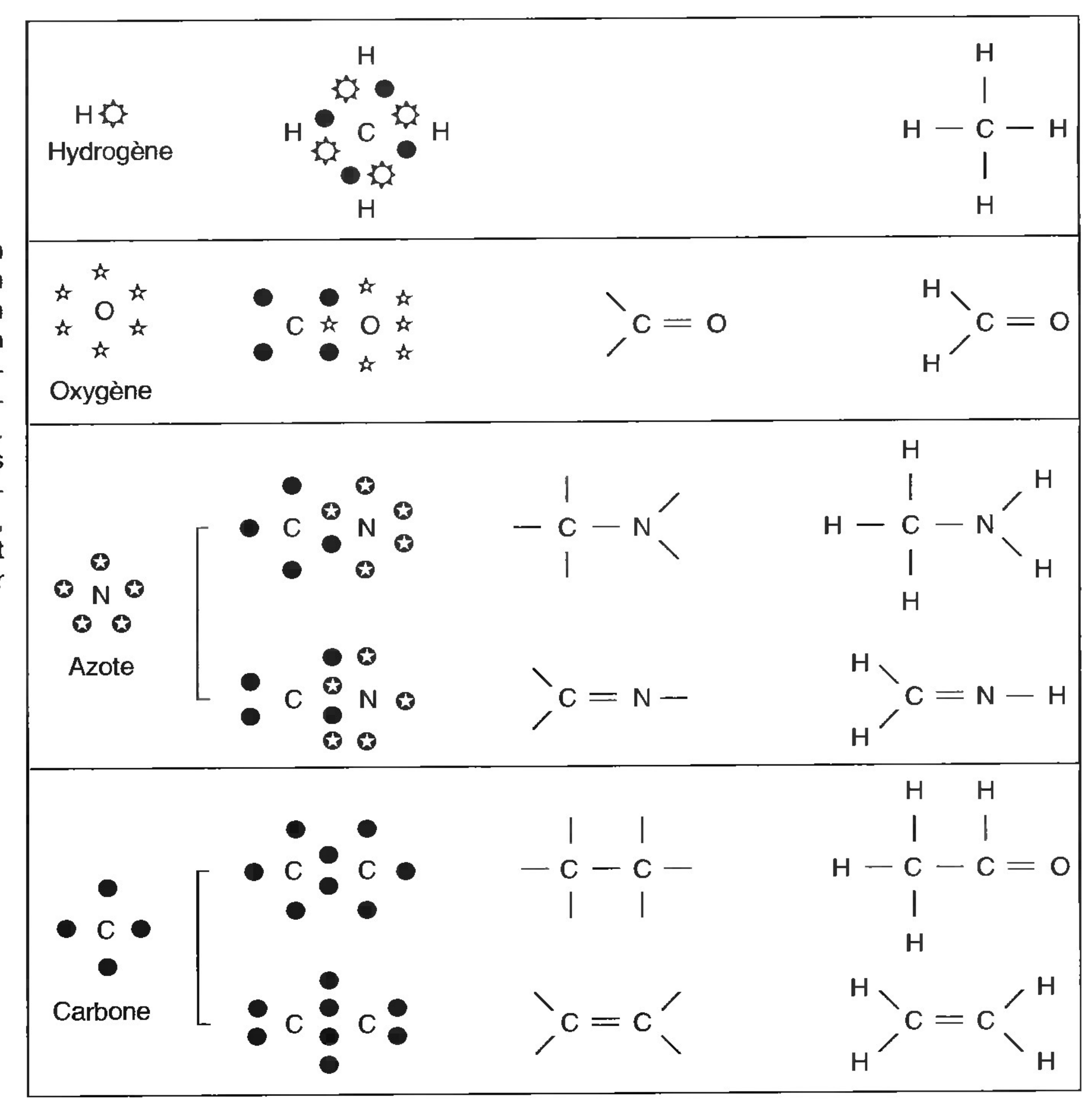


TABLEAU II-4
Liaisons carbone-carbone et constitution de squelettes macromoléculaires

Linéaire

Ramifié

Cyclique

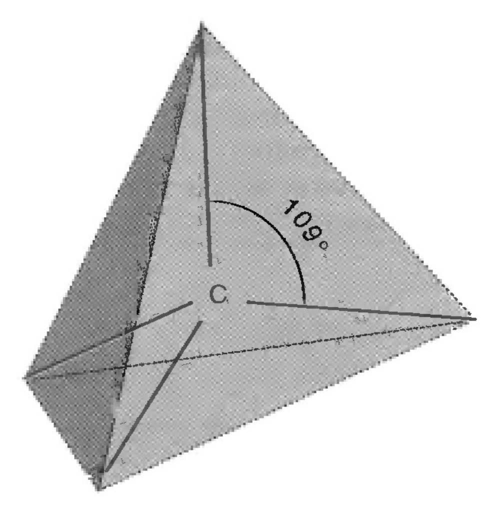


Fig. II-10 : L'atome de carbone.
Il occupe le centre de gravité d'un tétraèdre dont les sommets correspondent aux valences de l'atome.

1,34 Å
1,54 Å
A
B

Fig. II-11 : Liaisons entre deux atomes de carbone et possibilités de rotations.
A) Liaison simple = rotation libre.
B) Liaison double = pas de rotation possible.

carbones liés par une simple liaison, la rotation est totalement libre et les deux atomes tournent effectivement autour de l'axe C-C *(fig. II-11, A)*. Dans une même molécule, il y a donc un nombre important de positions possibles pour les autres atomes liés à ces deux carbones.

Ces rotations seront toutefois restreintes par l'environnement, des interactions électrostatiques immobilisant les atomes dans une position déterminée : *c'est la forme dite favorisée*, celle qui correspond au coût énergétique minimum. Il convient toutefois de bien se souvenir que les molécules carbonées pourront adopter des formes différentes de celle dite favorisée à partir du moment où une certaine quantité d'énergie leur est fournie ; autrement dit, elles pourront avoir plusieurs conformations.

Lorsqu'une double liaison s'établit entre atomes de carbones *, la distance inter-atomique est réduite et, surtout, **il n'y a plus de rotation possible** *(fig. II-11, B)* ; *l'axe de la double liaison et ceux des liaisons simples sont coplanaires, c'est-à-dire situés dans un même plan*, formant 3 angles de 120° : les atomes liés à ces deux atomes de carbone auront toujours la même position dans l'espace. La présence d'une double liaison dans un squelette moléculaire introduit donc une rigidité et une immobilité localisées.

En conclusion, les molécules organiques auront une organisation spatiale très variée ; elles peuvent être constituées par un nombre considérable d'atomes de carbone. Elles sont très longues et très volumineuses, ce sont des ***macromolécules*** dont la masse moléculaire peut atteindre plusieurs centaines de milliers de daltons **.

Ces macromolécules adoptent une forme géométrique déterminée par la répartition optimale de toutes les liaisons : interactions polaires avec l'eau et liaisons hydrophobes disposées vers l'intérieur de la molécule.

Ce sont des molécules très fragiles, difficiles à extraire, dont la conformation peut très sensiblement varier avec les méthodes d'extraction ; c'est pourquoi les méthodes douces, faisant appel notamment à l'ultracentrifugation (voir p. 62), mises au point à partir de 1940, ont considérablement modifié les connaissances en biochimie.

On distingue 4 sortes d'espèces organiques constituant la matière vivante : les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques ; elles seront étudiées dans les prochains chapitres. La constitution de ces macromolécules, échafaudages atomiques complexes, fait appel à différents types de liaisons chimiques dont il est important de bien connaître les caractéristiques.

* Il en est de même lorsqu'une double liaison s'établit entre d'autres atomes que le carbone.

** Dalton, unité utilisée pour déterminer la masse moléculaire : il correspond à la masse d'un seul atome d'hydrogène.

5. LES FORCES DE LIAISON EN BIOCHIMIE *

La tendance des atomes à s'unir n'est qu'un cas particulier de la thermodynamique selon laquelle tout système évolue spontanément vers l'état où il est le plus stable, c'est-à-dire celui où son énergie (enthalpie libre) est minimale.

5.1. LA LIAISON COVALENTE

Cette liaison correspond à la mise en commun d'électrons; elle permet aux atomes liés d'avoir une configuration électronique stable, c'est-à-dire 8 électrons sur la couche externe. Lorsque les atomes intéressés comportent un grand nombre d'électrons, seule la répartition de ceux de la couche externe est modifiée.

C'est une liaison très forte qui nécessite, pour être rompue, un apport énergétique compris entre 350 et 850 kJ/mole.

On distingue, selon le nombre d'électrons mis en commun, la simple liaison (2 électrons forment une paire) dite liaison σ, la double liaison (une seconde paire d'électrons formant une deuxième liaison dite π qui est très mobile) et la triple liaison (une liaison σ et deux liaisons π).

Ces liaisons jouent un rôle considérable dans la constitution des molécules et dans le métabolisme *(tab. II-5)*, **mais pas dans la distribution des molécules dans la cellule**. En effet, si cette distribution était due à des liaisons covalentes, une cellule serait une seule molécule. *Ce sont donc d'autres liaisons plus faibles qui interviennent dans les associations intermoléculaires constituant la cellule.*

5.2. LES LIAISONS INTERMOLÉCULAIRES OU FORCES DE VAN DER WAALS

Elles sont de nature électrostatique et dues à une distribution asymétrique des électrons formant la ou les liaisons entre atomes. Si cette asymétrie est permanente, c'est-à-dire si elle est due à la différence d'électronégativité des deux atomes considérés, on dit que la liaison est polarisée et qu'elle forme un dipôle électrique permanent. Lorsque 2 molécules sont suffisamment proches (3 à 4 Å), il y a attraction entre elles par l'intermédiaire des dipôles établis au niveau des liaisons entre atomes les constituant; cependant dès que les nuages électroniques s'interpénètrent, il y a répulsion *(fig. II-12)*. Il existe donc une distance à laquelle l'attraction est maximale; elle correspond à la somme des rayons de Van der Waals des atomes formant les liaisons : c'est *la distance de Van der Waals. La résultante de ces forces de Van der Waals qui s'exercent entre liaisons appartenant à des molécules différentes conduit à des attractions moléculaires.*

Les énergies mises en jeu sont toujours très faibles et pour rompre ce type de liaisons il suffit de quelques kJ/mole. Facilement détruites par l'agitation thermique, ces forces jouent cependant un rôle très important en biologie *lorsqu'elles peuvent être établies entre un grand nombre d'atomes appartenant à deux molécules proches qui présentent de larges surfaces de contact.*

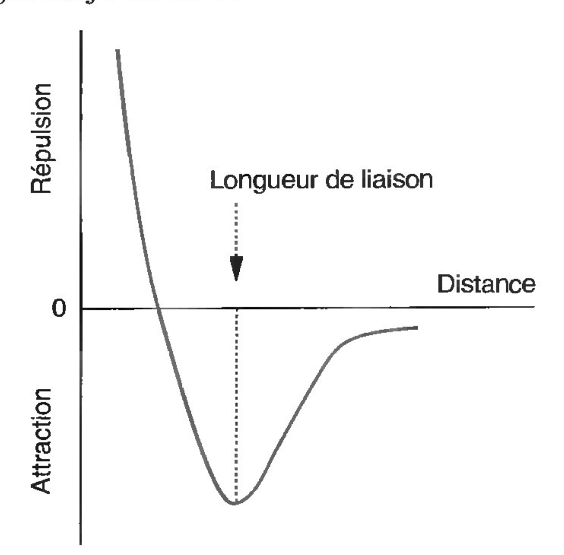


Fig. II-12 : Importance des interactions de Van der Waals en fonction des distances intermoléculaires.

* Nous tenons à remercier P. DIZABO, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, qui a bien voulu relire ce chapitre.

TABLEAU II-5

Principales combinaisons entre fonctions rencontrées dans les mécanismes biochimiques

Les esters phosphoriques sont formés par la combinaison d'un alcool et d'un phosphate

$$-CH_2-OH + HO-PO(O^-)-O^- \longrightarrow -CH_2-O-PO(O^-)-O^- + H_2O$$

Alcool — Phosphate — Ester phosphorique (souvent écrit $-C-O-Ⓟ$)

Les esters sont formés par la combinaison d'un acide et d'un alcool

$$-C(=O)OH + OH-CH_2- \longrightarrow -C(=O)-O-CH_2- + H_2O$$

Acide — Alcool — Ester

Les amides sont formées par la combinaison d'un acide et d'une amine

$$-C(=O)OH + H_2N-C- \longrightarrow -C(=O)-NH-C- + H_2O$$

Acide — Amine — Amide

Les liaisons acyl-phosphate, riches en énergie, se forment par la combinaison d'un groupe carboxyle et d'un phosphate

$$-C(=O)OH + HO-PO(O^-)-O^- \rightleftharpoons -C(=O)-O-PO(O^-)-O^- + H_2O$$

Acide — Phosphate — Acyl-phosphate

(Les réactions entre phosphates conduisant à la formation de liaisons anhydride d'acide, riches en énergie, existent également ; voir 1re partie, chap. VI, p. 129.)

Elles ne se manifestent qu'à l'occasion de contacts intra ou intermoléculaires directs. On les dit « hydrophobes » car elles n'ont de réelle importance que dans les parties de molécules qui ne sont pas en contact avec l'eau; au niveau de ces dernières, ce sont les liaisons ioniques et hydrogène qui dominent.

5.3. LA LIAISON HYDROGÈNE

Ce sont des interactions électrostatiques entre une molécule possédant une charge δ^+ et une autre possédant une charge δ^-, dont nous avons vu un exemple dans la molécule d'eau. La liaison hydrogène, ou *liaison H*, est un cas particulier de liaison intermoléculaire; cette interaction est favorisée par la petitesse de l'atome d'hydrogène qui permet une approche suffisante de l'atome électronégatif; elle est donc plus forte que la liaison de Van der Waals.

La liaison H s'établit toujours entre un atome d'hydrogène engagé dans une liaison covalente polarisée et un atome électronégatif (donc possédant un ou plusieurs doublets libres, oxygène, azote), lui aussi engagé dans une liaison covalente polarisée, qui attire vers lui les électrons de liaison *(fig. II-13).*

Ce sont des liaisons faibles qui nécessitent pour être rompues un apport énergétique compris entre 20 et 40 kJ/mole.

5.4. LA LIAISON IONIQUE

C'est une liaison qui s'établit **entre atomes présentant une forte différence d'électronégativité : il y a transfert d'un électron de l'atome le moins électronégatif vers celui qui l'est le plus;** le nombre d'électrons n'est alors plus le même que celui des protons. En toute rigueur, on ne devrait pas utiliser le terme liaison puisque les ions formés ne sont pas liés l'un à l'autre, *le positif pouvant changer continuellement de partenaire négatif.* Le sodium par exemple peut perdre facilement son électron le plus périphérique pour donner un cation Na^+; le chlore capte facilement un électron dans sa couche périphérique et devient un anion Cl^-; dans le chlorure de sodium solide chaque Na^+ est associé par des forces électrostatiques à 6 Cl^-, et vice versa; cette association est très forte. En solution, les molécules d'eau s'intercalent et entrent en compétition avec les charges ioniques, la quantité d'énergie nécessaire pour les rompre est alors très faible.

En règle générale, les liaisons qui s'établissent de préférence entre les molécules sont celles qui nécessitent le moins d'énergie pour être formées, Van der Waals d'abord, hydrogène ensuite. C'est parce qu'elles sont en très grand nombre que ces liaisons maintiennent l'association entre les molécules.

Fig. II-13 : Exemple de liaisons H, liaisons entre bases dans l'ADN.

Ces deux types de liaisons sont particulièrement importants en biologie puisque les molécules portant des groupements polaires pourront établir des liaisons H avec l'environnement, alors que ***celles ne possédant que des groupements apolaires seront exclues du milieu aqueux et auront tendance à s'associer entre elles par des forces de Van der Waals*** *(fig. II-14).*

Il faut avoir toujours présent à l'esprit que les liaisons H et de Van der Waals sont faibles ; elles sont aisément rompues au cours des collisions intermoléculaires provoquées par l'agitation thermique. Elles se reforment aussi très rapidement ; **les associations moléculaires auxquelles elles participent seront donc en constant remaniement**.

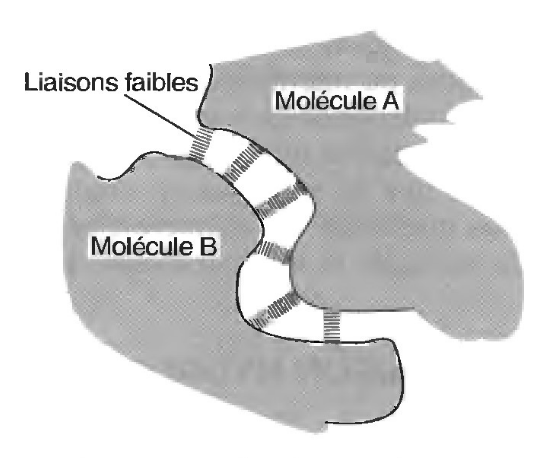


Fig. II-14 : Importance des liaisons faibles dans les associations intermoléculaires.

C'est parce qu'elles sont en très grand nombre que les liaisons faibles (liaisons H, liaisons ioniques, interactions de Van der Waals) maintiennent l'association entre molécules ; comme elles ne peuvent s'établir qu'entre groupements chimiques très proches, la complémentarité des formes macromoléculaires joue un rôle extrêmement important dans les structures et les mécanismes biologiques (voir p. 60).

CHAPITRE III

Les protéines

Les protéines sont des constituants particulièrement importants puisqu'ils forment entre *55 et 85 % de la matière sèche*, selon les tissus considérés. Certaines molécules protéiques ont un *rôle structural* (collagène, osséine, kératine des ongles et des poils…), d'autres un *rôle fonctionnel* (hémoglobine…) ou *régulateur* (enzymes, hormones…) ; elles peuvent constituer des *réserves* (ovalbumine de l'œuf), intervenir dans *la défense de l'organisme* (anticorps) ou dans *la motricité* (actine, myosine…). Ce sont donc, quantitativement et qualitativement, des constituants essentiels des êtres vivants, **dont ils sont, d'ailleurs, caractéristiques.**

L'analyse élémentaire montre que les protéines sont formées à partir de quatre éléments principaux, le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote ; ce sont donc des *composés quaternaires* ; à ces quatre éléments s'ajoutent généralement du phosphore et du soufre.

Leur masse moléculaire est très élevée, comprise entre 6 000 et 500 000 daltons ; ce sont des **macromolécules.**

Elles peuvent être hydrolysées totalement par l'acide chlorhydrique :

$$\underbrace{[\text{Protéine} + \text{HCl 6 N}]}_{\textit{24 heures à 110 °C}} \longrightarrow \text{n acides aminés (ou aminoacides)}$$

Les acides aminés sont les molécules de base qui, en s'associant, constituent la protéine : **ce sont les monomères** ; la protéine est donc **un polymère.**

Lorsque l'hydrolyse libère uniquement des acides aminés, on parle d'*holoprotéine* ; lorsqu'il apparaît des substances de nature différente, formant une unité distincte appelée *groupement prosthétique*, qui modifie les propriétés de la molécule, on parle d'*hétéroprotéine*.

1. LES DONNÉES DE BASE

1.1. LES ACIDES AMINÉS

Ce sont donc les unités structurales, ou monomères, des protéines.

On en trouve *20 différents dans les protéines des cellules eucaryotes* : ce sont les acides aminés courants et leur nom se termine très souvent par le suffixe « ine ». **C'est avec ces vingt acides aminés que sont construites toutes les protéines.** *C'est la diversité des arrangements possibles, à partir de cet alphabet fondamental,* qui permet des constructions moléculaires aussi différentes que la soie, l'albumine, l'hémoglobine, l'actine…

A. Formule générale

Leur molécule contient toujours *une fonction acide*, COOH, et *une fonction amine*, NH_2. Celle-ci est généralement située, dans les acides aminés naturels, en position α ; ce sont donc des acides α-aminés dont la formule générale est représentée sur la *figure III-1*.

Le radical R permet par contre d'identifier l'acide aminé, comme le montrent les exemples, glycine et leucine *(fig. III-2)*.

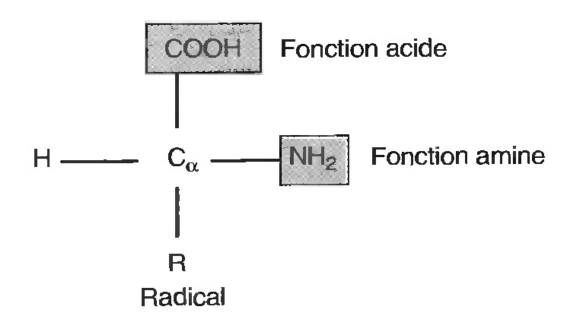


Fig. III-1 : Formule générale d'un acide aminé.

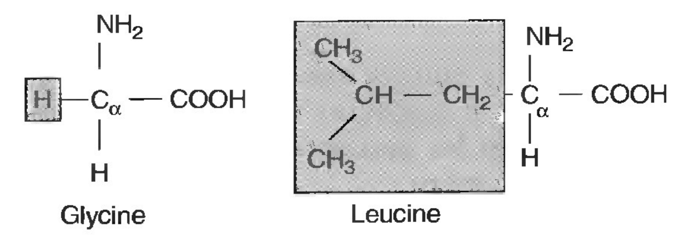


Fig. III-2 : Deux exemples d'acides aminés.
Les radicaux sont encadrés.

B. Propriétés des acides aminés

On distingue celles communes à tous les acides aminés et celles propres à certains acides aminés.

a. Propriétés communes à tous les acides aminés

Elles sont liées à l'existence de fonctions identiques chez tous les acides aminés.

• *L'asymétrie.* Elle est due à l'existence d'*un carbone asymétrique*, c'est-à-dire portant 4 fonctions distinctes, nommé Carbone α, Cα.

Ces fonctions peuvent se disposer de manière différente par rapport au Cα. Les molécules ainsi obtenues ne présentent pas le même arrangement spatial : ce sont des molécules ***chirales*** (du grec *kheir,* main) car, telles la main gauche et la main droite, elles ne peuvent pas être confondues avec leur image dans un miroir. Ce sont donc des **stéréoisomères** *(fig. III-3)*. On distingue ainsi, pour un même acide aminé, deux formes possibles qui n'ont pas les mêmes propriétés, notamment pas le même pouvoir rotatoire (déviation de la lumière polarisée), ce qui permet de les dénommer forme D (pour Dextrogyre) et forme L (pour Lévogyre).

Un seul acide aminé ne présente pas de forme D et L, c'est la *glycine* chez qui le radical correspond à un seul atome d'hydrogène. Le carbone portant les fonctions amine et acide et deux atomes d'hydrogène *(fig. III-2)* n'est plus asymétrique ; il admet un plan de symétrie : il n'y a pas alors d'isomérie.

Seuls les acides aminés de la série L sont utilisés et synthétisés par les cellules eucaryotes.

Des acides aminés de la série D peuvent être synthétisés au laboratoire et mélangés dans un milieu de culture à des acides aminés de la série L ; les cellules eucaryotes placées dans ce milieu n'utiliseront que les formes L : il y a sélectivité de l'absorption.

Par contre des acides aminés de la série D se rencontrent chez certaines bactéries.

• *L'ionisation.* Deux des groupements portés par le carbone asymétrique sont ionisables ; ce sont les fonctions acide et amine ; elles peuvent, selon le pH du milieu, prélever ou céder des protons *(fig. III-4)*.

Si l'on fait varier progressivement le pH, d'un milieu nettement acide vers un milieu fortement basique, l'acide aminé va passer de la forme cationique à la forme zwitterion puis à une forme anionique. Pendant une zone plus ou moins importante de pH, l'acide aminé est sous forme d'un ion double, c'est-à-dire qu'il est *électriquement neutre* ; cette zone de pH est dite *isoélectrique* ; le pH correspondant au milieu de cette zone isoélectrique est appelé pH isoélectrique ou pHi ; placé dans un champ électrique à ce pH la molécule ne se déplace pas.

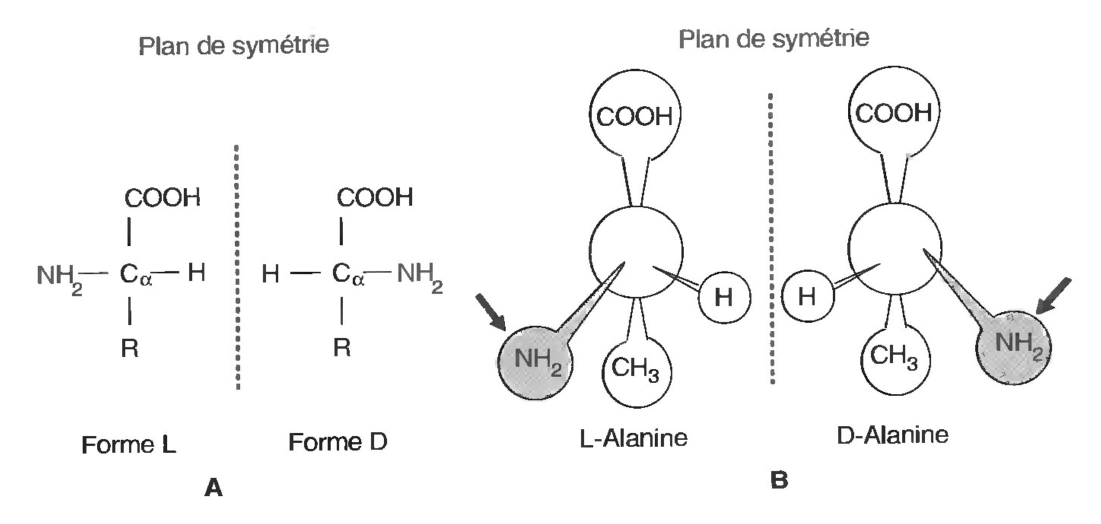


Fig. III-3 : Stéréoisomérie des aminoacides.
A) Représentation dans un plan.
B) Représentation tridimensionnelle.
Lorsque le groupement amine est situé à gauche, l'acide aminé appartient à la forme L ; lorsqu'il est situé à droite, la molécule est de forme D.

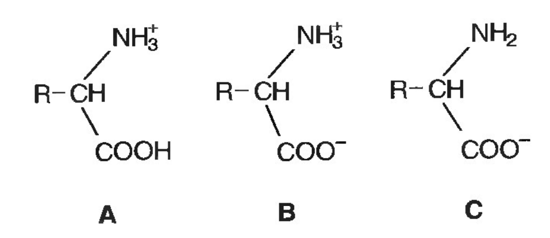


Fig. III-4 : Ionisation des acides aminés.
A) Dans un milieu acide, donneur de protons, l'acide aminé se comporte comme un cation ; dans un champ électrique, il migre vers la cathode.
B) À un pH intermédiaire, c'est un ion double, une molécule dipolaire, un *zwitterion*.
C) Dans un milieu basique, accepteur de protons, l'acide aminé se comporte comme un anion ; dans un champ électrique, il migre vers l'anode.

Pour le plus simple des acides aminés, la glycine, ce pHi est égal à pH 6 ; on dit que c'est *un acide aminé neutre*. Cependant, tous les aminoacides n'ont pas un pHi de cette valeur ; celle-ci dépend en effet largement des *propriétés du radical*. Si celui-ci est composé de groupements apolaires ou de groupements polaires neutres, la valeur du pHi ne dépend que des fonctions amine et acide communes à tous les acides aminés ; si par contre *R contient des fonctions ionisables*, comme dans l'acide aspartique ou la lysine *(fig. III-5)*, le pHi sera différent de celui de la glycine. Les propriétés du radical doivent donc être prises en compte*. Pour les acides aminés acides, le pHi sera plus bas (le pHi de l'acide aspartique est de 2,9) ; pour les acides aminés basiques, le pHi sera plus élevé (le pHi de la lysine est de 9,75).

b. *Propriétés liées à la nature du radical : la classification des acides aminés*

Les radicaux d'acides aminés sont très différents notamment en ce qui concerne *leur dimension*, c'est-à-dire leur encombrement, *leur polarité*, donc leur possibilité d'établir des liaisons H avec l'eau ou d'autres molécules, *leur degré d'ionisation*, *leur nature cyclique*, *la présence de soufre*...

Selon les caractères que l'on fait intervenir en priorité, il est possible d'établir plusieurs classifications. Celle qui est présentée dans les *tableaux III-1 et III-2* n'est pas exempte de critiques ; elle présente l'avantage de mettre en avant deux propriétés qui jouent un rôle particulièrement important dans l'établissement de la forme des protéines : **la polarité et l'encombrement des radicaux.**

---

* D'autant plus que, comme nous le verrons (p. 41), les fonctions acide et amine disparaissent lorsque s'établit la liaison peptidique ; l'ionisation des acides aminés dépend alors uniquement de leurs radicaux ; ce sont eux qui, en fonction des proportions relatives des groupements + et –, donneront une charge globale à la protéine.

$$HOOC-CH_2-CH(NH_3^+)(COO^-)$$

Acide aspartique au pHi

$$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)(COO^-)$$

Lysine au pHi

Fig. III-5 : Exemples d'aminoacides à radical ionisable.

C. La séparation des acides aminés

Déterminer la nature des acides aminés présents dans un mélange résultant d'une hydrolyse de protéine est la première étape indispensable pour l'étude de cette protéine.

La séparation de ces acides aminés ne peut se faire qu'en utilisant les propriétés physicochimiques qui les différencient, c'est-à-dire celles de leur radical. Trois méthodes sont utilisées de manière courante.

a. La chromatographie

Son principe est fondé sur *les différences de solubilité* que présentent les divers acides aminés vis-à-vis d'un même solvant.

On dépose le mélange d'acides aminés (par exemple : Asp., Glu., Ser., Gly., Thr., His., Ala., Tyr., Lys., Arg., Pro., Val., Met., Leu., Ile., Phe.) sur un support mince et poreux qui constitue la *phase stationnaire*, généralement un papier plus ou moins épais. Le bord du papier est alors immergé dans un solvant *(fig. III-6, A)* ou un mélange de solvants (mélange de phénol et d'eau par exemple) et l'ensemble, papier et support, est placé dans une enceinte où l'atmosphère est saturée de solvant.

Le solvant, qui constitue la *phase mobile*, progressant par capillarité vers l'autre extrémité du papier, *entraîne les acides aminés en fonction de leur plus ou moins grande solubilité*. Après quelques heures de migration et séchage du chromatogramme, on peut colorer, par la ninhydrine à chaud, les acides aminés. Ces derniers apparaissent répartis sur une verticale ; ils sont d'autant plus éloignés du point de dépôt initial qu'ils présentent plus d'affinités pour le solvant *(fig. III-6, B)*.

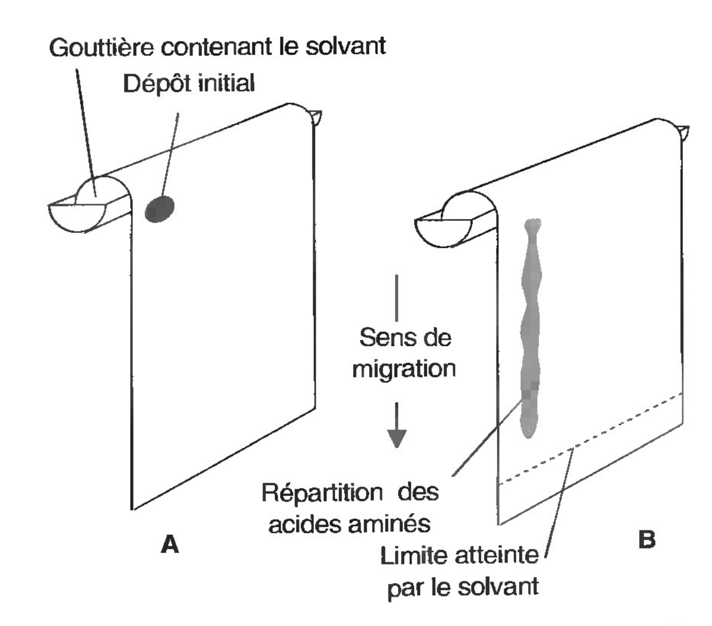


Fig. III-6 : Chromatographie monodimensionnelle ou première migration d'une chromatographie bidimensionnelle.

Cette première migration n'aboutit le plus souvent pas à une séparation suffisamment nette des différents acides aminés du mélange ; c'est pourquoi on ne révèle (c'est-à-dire colore) généralement pas ce premier chromatogramme. La feuille est simplement séchée, retournée et une *seconde chromatographie*, où la migration des aminoacides s'effectuera perpendiculairement à la précédente *(fig. III-7, A)*, est alors mise en route avec un solvant différent (mélange d'acide acétique et de butanol par exemple). C'est après cette seconde migration que les acides aminés sont localisés par la réaction colorée à la ninhydrine ; **la chromatographie est bidimensionnelle** *(fig. III-7, B)*.

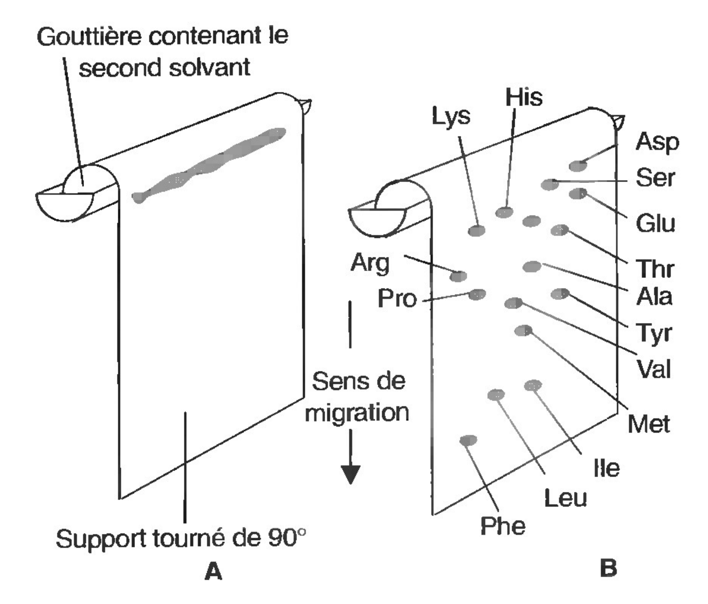


Fig. III-7 : Seconde migration d'une chromatographie bidimensionnelle.

TABLEAU III-1
Acides aminés neutres et polaires
(les radicaux sont encadrés)

Petits acides aminés

Glycine (Gly): $H-CH(NH_2)-COOH$

Sérine (Ser): $HO-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Thréonine (Thr): $CH_3-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$

Acide aspartique (Asp): $HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ ⇄ Aspartate: $^{-}OOC-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$

Asparagine (Asn): $H_2N-C(=O)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Gros acides aminés

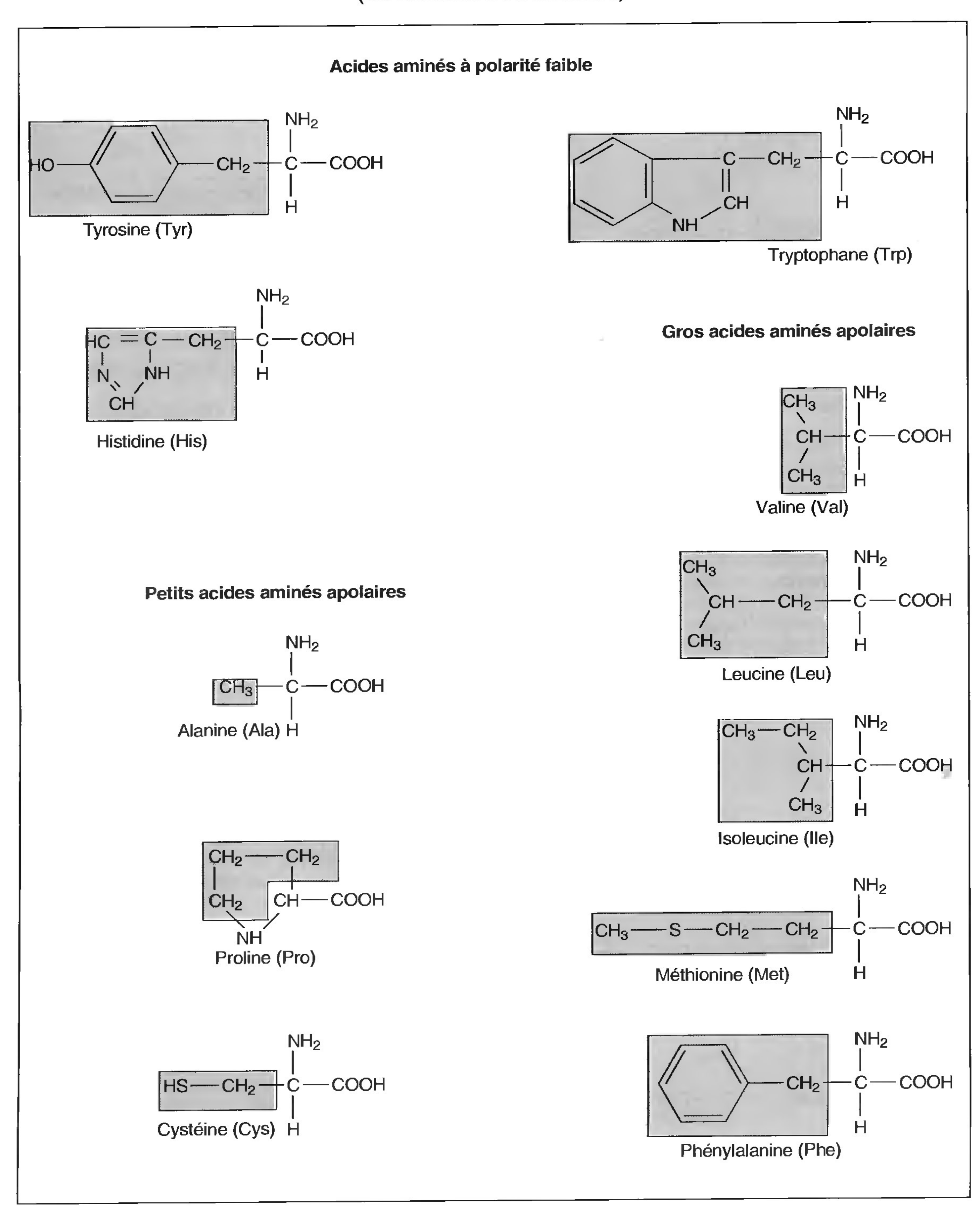
Glutamate: $^{-}OOC-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$ ⇄ Acide glutamique (Glu): $HOOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Glutamine (Gln): $H_2N-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Lysine (forme ionisée): $^{+}H_3N-(CH_2)_4-CH(NH_3^+)-COO^-$ ⇄ Lysine (Lys): $H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Arginine (forme ionisée): $H_2N-C(=NH_2^+)-(CH_2)_3-CH(NH_3^+)-COO^-$ ⇄ Arginine (Arg): $H_2N-C(=NH)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

TABLEAU III-2
Acides aminés apolaires et acides aminés à faible polarité
(les radicaux sont encadrés)



Avec cette méthode, les différents acides aminés d'un mélange de composition inconnue sont déterminés par comparaison avec des témoins.

b. La chromatographie sur colonne

Cette méthode fait appel aux propriétés acido-basiques et ioniques des différents aminoacides.

Elle utilise une colonne de verre remplie de granules de résine synthétique contenant des groupes chargés. Celles qui portent des groupements anioniques sont appelées échangeuses de cations; celles qui portent des cations sont appelées échangeuses d'anions.

Pour comprendre le principe de cette méthode de séparation, prenons l'exemple d'une résine échangeuse de cations *(fig. III-8).* Sur les granules de résine sont fixés, par exemple, des groupements sulfoniques, SO_3^-, auxquels sont liés des Na^+; la résine est chargée.

Dans un premier temps, les acides aminés en solution dans un milieu à pH 3 sont versés au sommet de la colonne. À ce pH, les aminoacides sont cationiques, mais plus ou moins, selon la nature de leur radical; ils vont déplacer les ions Na^+ liés aux résines: ceux présentant, à pH 3, une charge positive importante (Lys., Arg., His.) seront fortement liés, alors que ceux qui en présentent le moins (Asp., Glu.) le seront faiblement.

Dans un second temps, on fait passer sur la colonne un liquide de pH croissant (c'est l'*élution*); lorsque le pH de l'éluant se rapproche du pHi de l'acide aminé, celui-ci se détache; entraîné par l'éluant, il traverse la colonne et peut être recueilli à sa base. Le pHi des divers acides aminés étant différent, ceux-ci sortent de la colonne successivement.

On collecte par petites quantités le liquide sortant de la colonne; celui-ci, chauffé en présence de ninhydrine, se colore alors plus ou moins intensément selon la quantité d'acides aminés présents, ce qui permet un dosage spectrophotométrique. On peut ainsi tracer, en fonction du pH et de la quantité d'éluant, une courbe où les différents pics correspondent à des acides aminés déterminés *(fig. III-9).* Le système a été automatisé.

c. L'électrophorèse

Elle est fondée sur *la différence de charges* existant entre les acides aminés. Placés dans un champ électrique, sur un support poreux (papier, acétate de cellulose...) imbibé par une solution tampon de pH connu *(fig. III-10, A),* ils se déplaceront soit vers l'anode, pôle + (ils se comportent alors en anions), soit vers la cathode, pôle – (ce sont alors des cations).

Si la solution est à pH 4, par exemple, les acides aminés portant une seconde fonction acide sont chargés négativement et se dirigent vers l'anode (anions); par contre, les aminoacides basiques chargés positivement (cations) se dirigent vers la cathode *(fig. III-10, B).*

Les acides aminés neutres migrent également vers la cathode mais, leur charge étant faible, plus lentement.

Les acides aminés étant de petites molécules, leur déplacement n'est pas freiné par la trame du support sur lequel ils ont été déposés, souvent du papier; on obtient ainsi *des groupes d'acides aminés* plutôt qu'une séparation individuelle. Il n'en est pas de

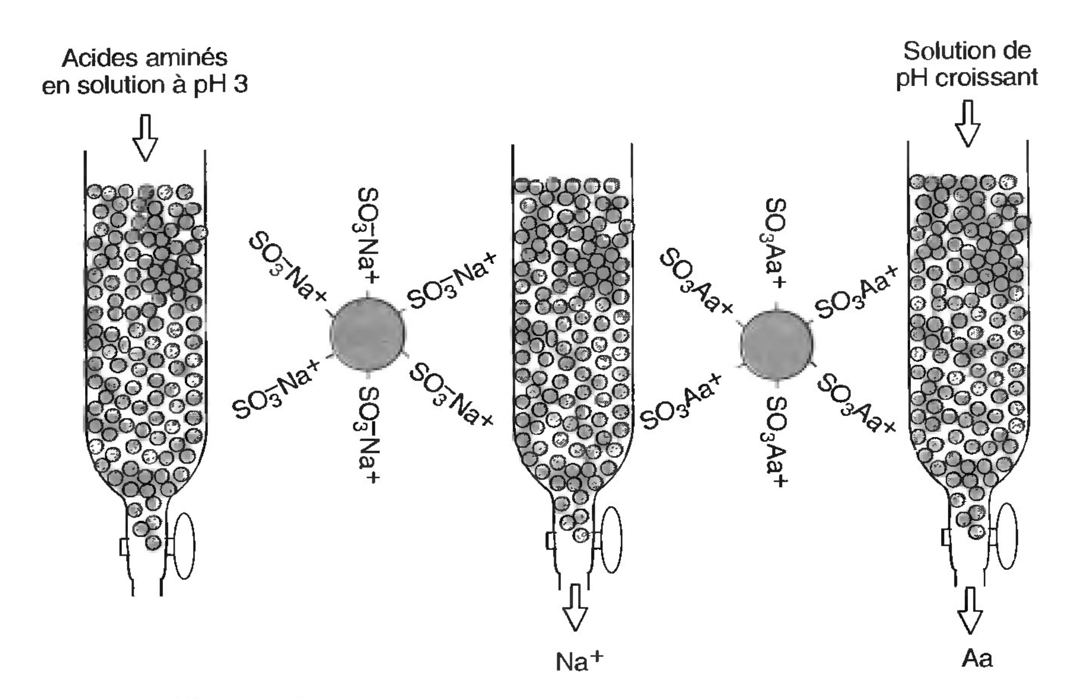


Fig. III-8 : Chromatographie sur colonne.

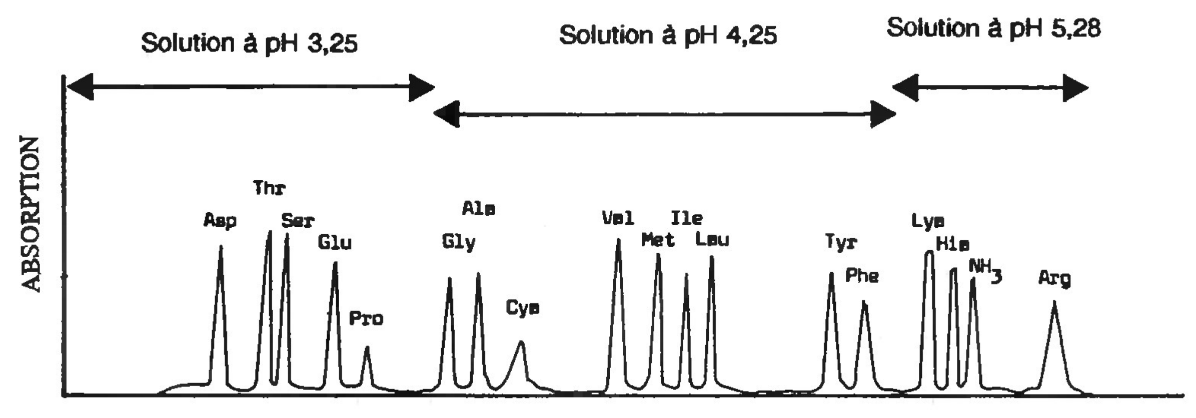


Fig. III-9 : Courbe tracée par analyse spectrophotométrique d'un éluant.

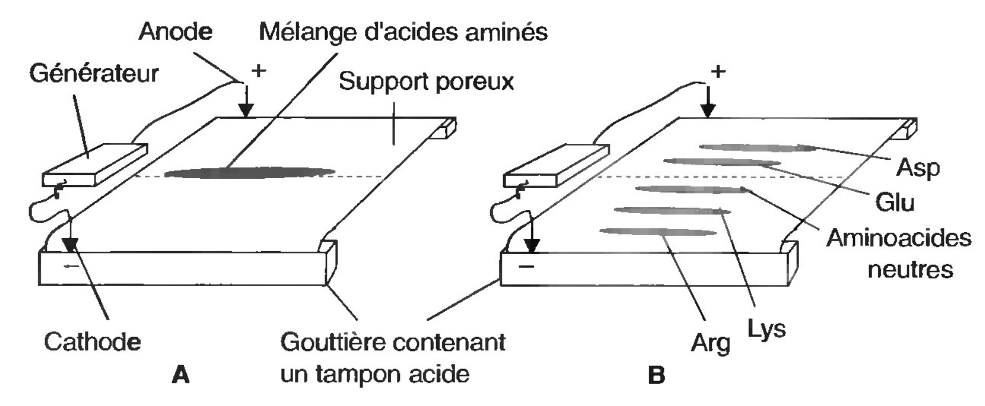


Fig. III-10 : Électrophorèse.
A) Le mélange d'acides aminés est déposé sur un support poreux imbibé par un tampon acide.
B) Placés dans un champ électrique, les acides aminés vont se déplacer en fonction de leur charge propre ; ceux dont les radicaux sont chargés négativement (acide aspartique, acide glutamique) vont aller vers l'anode (pôle +), ceux où ils sont chargés positivement (arginine, lysine) vont migrer vers la cathode (pôle –).

même lorsque cette technique est mise en œuvre avec des molécules plus volumineuses, comme les protéines (voir plus loin, p. 65) ; c'est alors une méthode de séparation plus efficace puisqu'elle fait intervenir, simultanément, *la charge nette et l'encombrement de la molécule.*

1.2. ENCHAÎNEMENT DES ACIDES AMINÉS : LA LIAISON PEPTIDIQUE

Les acides aminés peuvent s'associer par l'intermédiaire d'une liaison covalente, établie **entre le carboxyle d'un acide aminé et l'amine d'un autre acide aminé**, avec élimination d'une molécule d'eau *(fig. III-11)* : c'est ***la liaison peptidique*** ; cette nouvelle molécule est *un dipeptide.*

Un troisième aminoacide peut, de la même façon, s'unir à ce dipeptide ; on a alors *un tripeptide.* Lorsque n acides aminés sont enchaînés, on a *un polypeptide.* C'est à partir du moment où n est supérieur à 60 que l'on parle de protéine ; la molécule, très volumineuse, n'est alors plus dialysable, c'est-à-dire susceptible de traverser une membrane hémiperméable (voir p. 61).

Plusieurs points méritent d'être soulignés :

1) Quelle que soit la longueur de la chaîne, dix ou cent aminoacides, le groupement NH_3^+ est toujours terminal, c'est l'extrémité **N-terminale** ; le COO^- situé à l'autre bout du polypeptide constitue le **C-terminal.**

La localisation d'un acide aminé est toujours effectuée par rapport à l'extrémité N-terminale du polypeptide.

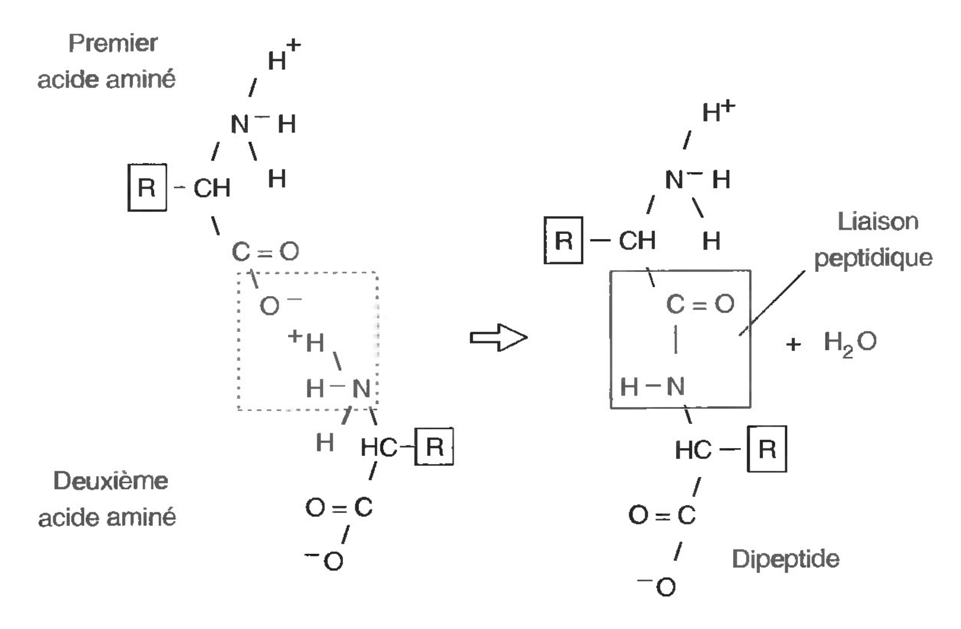


Fig. III-11 : Formation de la liaison peptidique.

Ainsi dans le polypeptide suivant :

$^{+}H_3N$-Asp-Leu-Val-Ala-Cys-Asp-COO^{-}

on dira que la valine est en position 3, la cystéine en position 5.

2) Les groupements NH_2 et COOH liés au carbone asymétrique, à l'exception de ceux occupant les positions terminales, sont, au moment de la formation du peptide, engagés dans la liaison covalente ; **les propriétés de ce peptide seront donc essentiellement dues aux propriétés des radicaux des aminoacides le constituant.**

3) Avec quelques acides aminés bien définis on peut obtenir des molécules très différentes puisque celles-ci sont caractérisées par **l'ordre d'enchaînement**. Ainsi N^{+}-Ser-Leu-Arg-C^{-} diffère de N^{+}-Leu-Ser-Arg-C^{-} et de N^{+}-Ser-Arg-Leu-C^{-}.

Si les vingt acides aminés connus dans les cellules eucaryotes participent à la construction d'une protéine comportant n aminoacides (avec n supérieur à 20) le nombre de combinaisons possibles sera : 20^n.

On voit tout de suite l'importance de cette grande diversité puisque si n est égal à 100, ce qui correspond à une protéine de dimension moyenne, il y aura 20^{100} protéines qui pourront être construites. Comme les vingt acides aminés possèdent, grâce à leur radical, des caractères différents, il y a élaboration de molécules aux propriétés très variées ; **il y a une véritable identité protéique**. Les protéines pourront être spécifiques d'un tissu, d'un individu ; on en verra ultérieurement toute l'importance.

Cette *spécificité protéique* étant fondée sur *l'ordre d'enchaînement* des acides aminés, celui-ci ne peut pas être laissé au hasard ; nous verrons qu'il est l'expression d'*une information* stockée au niveau de la molécule d'ADN.

R_1 R_3 R_5

$$H_2N\text{-}CH\text{-}CONH\text{-}CH\text{-}CONH\text{-}CH\text{-}CONH\text{-}CH\text{-}CONH\text{-}CH\text{-}CONH\text{-}CH\text{-}COOH$$

R_2 R_4 R_6

Extrémité N-terminale — Liaison peptidique — Résidu d'acide aminé — Extrémité C-terminale

1.3. LA STRUCTURE PRIMAIRE

A. Définition

Elle correspond à l'ordre d'enchaînement des acides aminés depuis l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale ; c'est-à-dire ***la séquence des acides aminés***.

Le premier polypeptide dont la séquence fut déterminée est l'insuline, petite molécule constituée par 51 aminoacides, grâce aux travaux de **SANGER** (1953).

B. Méthode de détermination

La méthode de Sanger, assez longue et délicate à mettre en œuvre, a été abandonnée et remplacée par la méthode d'**EDMAN**.

a. Détermination de la séquence d'un petit polypeptide

Dans cette méthode le groupement N-terminal du polypeptide est condensé, *en milieu alcalin*, avec le phényl-isothiocyanate (PTH) pour former un peptide N-phényl thiocarbamylé :

$$\underbrace{C_6H_5{-}N{=}C{=}S}_{\text{PTH}} + \underbrace{H_2N{-}\overset{R_1}{\overset{|}{C}H}{-}CONH{-}\underset{R_2}{\underset{|}{C}H}{-}CONH{-}}_{\text{Peptide}} \rightarrow$$

$$C_6H_5{-}NH{-}\overset{S}{\overset{\|}{C}}{-}NH{-}\overset{R_1}{\overset{|}{C}H}{-}CONH{-}\underset{R_2}{\underset{|}{C}H}{-}CONH{-}$$

Peptide N-phényl thiocarbamyle

En milieu acide faible, il se produit une cyclisation avec rupture de la première liaison peptidique ; il y a libération d'un PTH-amino-acide et d'un peptide réduit d'un acide aminé :

```
R1–CH—CO
   |    |
   NH   N–C6H5        +
    \  /
     C
     ||
     S
                       R3
                       |
         H2N–CH–CONH–CH–CONH–...
             |
             R2
```

On détache ainsi un seul acide aminé, le reste de la molécule est intact. On identifie le PTH-aminoacide par chromatographie, après l'avoir extrait, et l'*on peut répéter l'opération avec le peptide raccourci*, ce qui permet de déterminer la nature du second acide aminé. On peut ainsi **dégrader séquentiellement le peptide** en partant de l'extrémité N-terminale. Cette méthode a été automatisée.

b. Détermination de la séquence d'une protéine

La méthode précédente permet de déterminer l'ordre d'enchaînement des acides aminés pour un polypeptide ; elle n'est pas applicable, telle quelle, à une protéine comportant un nombre très élevé d'aminoacides.

La méthode utilisée nécessite donc une fragmentation de la protéine en polypeptides séquençables par la méthode d'EDMAN.

Pour que cette méthode soit utilisable il faut cependant une quantité importante de polypeptides *tous identiques* obtenus à partir de la protéine que l'on veut analyser.

Cela peut être réalisé si l'on coupe la protéine *en des endroits bien déterminés* ; on pourra alors utiliser une grande quantité de cette molécule. En effet, les coupures, étant spécifiques, libéreront toujours les mêmes polypeptides.

Prenons l'exemple d'un polypeptide que l'on désire fractionner en peptides plus courts :

NH_3^+–Arg–Lys–Met–Lys–Phe–Gly–Met–Arg–Gly–Asp–COO^-

Si l'on traite ce polypeptide par *le bromure de cyanogène*, la liaison peptidique coupée sera toujours celle située *après le carboxyle de la méthionine*. On obtiendra alors les peptides suivants :

(1) NH_3^+–Arg–Lys–Met–COO^-
(2) NH_3^+–Lys–Phe–Gly–Met–COO^-
(3) NH_3^+–Arg–Gly–Asp–COO^-

Ces différents peptides peuvent être séparés les uns des autres avec les méthodes utilisées pour séparer les aminoacides : électrophorèse, chromatographie sur colonne. *On obtient ainsi des solutions contenant toujours le même polypeptide en un grand nombre d'exemplaires* ; il est alors possible de le séquencer par la méthode d'EDMAN.

Si l'on traite le polypeptide de départ par *la trypsine*, les coupures auront toujours lieu *après le carboxyle de l'arginine ou celui de la lysine*. On obtiendra les peptides suivants :

(4) NH_3^+–Arg–COO^-
(5) NH_3^+–Lys–COO^-

(6) NH_3^+–Met–Lys–COO^-
(7) NH_3^+–Phe–Gly–Met–Arg–COO^-
(8) NH_3^+–Gly–Asp–COO^-

que l'on peut séparer et séquencer de la même manière que ceux obtenus après l'action du bromure de cyanogène.

Après *l'hydroxylamine*, les coupures se situent *entre l'arginine et la lysine*, ce qui permet d'obtenir ces peptides :

(9) NH_3^+–Arg–COO^-
(10) NH_3^+–Lys–Met–Lys–Phe–Gly–Met–Arg–Gly–Asp–COO^-

que l'on peut également séquencer.

À partir du nombre souvent élevé de peptides ainsi obtenus, on peut, *par superpositions des séquences*, établir celle de la protéine entière.

(4) NH_3^+–Arg–COO^-
(9) NH_3^+–Arg–COO^-
(5) NH_3^+–Lys–COO^-
(1) NH_3^+–Arg–Lys–Met–COO^-
(6) NH_3^+–Met– Lys–COO^-
(10) NH_3^+–Lys–Met–Lys–Phe–Gly–Met–Arg–Gly–Asp–COO^-
(2) NH_3^+–Lys–Phe–Gly–Met–COO^-
(7) NH_3^+–Phe–Gly–Met–Arg–COO^-
(8) NH_3^+–Gly–Asp–COO^-
(3) NH_3^+–Arg–Gly–Asp–COO^-

NH_3^+–Arg–Lys–Met–Lys–Phe–Gly–Met–Arg–Gly–Asp–COO^-

En principe relativement simple, cette méthode se révèle vite complexe lorsque le nombre de monomères est élevé. Il est donc toujours indispensable de vérifier si le nombre d'acides aminés obtenus après hydrolyse complète de la molécule (par exemple 26 Ala + 16 Tyr + 20 Cys...) correspond bien à celui des aminoacides présents dans la séquence proposée.

C. Importance de la structure primaire

Deux exemples permettront de la démontrer, celui de l'hémoglobine et celui des cytochromes.

L'hémoglobine est une chromoprotéine, c'est-à-dire une protéine portant un groupement coloré, contenue dans les hématies, qui assure le transport par la voie sanguine de l'oxygène des organes où la pression relative est élevée (poumons) vers les tissus utilisateurs.

Cette molécule complexe est formée par l'association de quatre sous-unités, chaque sous-unité étant constituée par une protéine, une globine, et un groupement associé (groupement prosthétique) coloré, l'hème (voir p. 59).

Dans chaque molécule, il y a donc 4 globines et 4 hèmes. Or ces globines ne sont pas rigoureusement identiques : il y a deux *chaînes α*, qui comportent *141* aminoacides, et deux *chaînes β*, qui en possèdent *146*.

Il existe en Afrique une grave maladie, *l'anémie falciforme* ou *drépanocytose*, qui se caractérise par une cristallisation de l'hémoglobine lorsque la pression d'oxygène devient faible. Or c'est dans les capillaires que cette pression est la plus basse ; la cristallisation de l'hémoglobine s'y produit, ce qui rend *les hématies non déformables* avec un aspect en faux ; elles ne peuvent alors plus circuler dans les vaisseaux les plus fins ; il y a des microthromboses et une hémolyse par hyperdestruction de globules rouges.

L'analyse des deux chaînes α et β révèle qu'elles comportent *le même nombre d'acides aminés* chez le sujet malade que chez le sujet sain, simplement **un acide aminé a changé** dans les chaînes β : un acide glutamique (polaire et chargé) est remplacé par une valine (hydrophobe). Il s'agit donc d'une mutation ponctuelle qui est, à terme, mortelle chez le sujet homozygote.

Les cytochromes ont une structure assez comparable à celle de chaque sous-unité de l'hémoglobine puisqu'ils sont formés par une globine à laquelle est associé un groupement prosthétique contenant du fer. Ce sont des transporteurs d'électrons :

$$\text{Cytochrome } Fe^{2+} \rightarrow \text{Cytochrome } Fe^{3+} + e^-$$

On en trouve chez tous les organismes (animaux comme végétaux) et dans la plupart des organites (mitochondries, plastes, réticulum endoplasmique...). Il en existe plusieurs types dont un, le cytochrome c, a été beaucoup étudié chez différentes espèces.

Ce cytochrome comporte *104 acides aminés* et l'analyse montre que 27 positions sont tou-

jours occupées, chez les différentes espèces, par les mêmes aminoacides, ce sont **les invariants**. Pour citer un exemple d'invariant, on trouve toujours, dans ces cytochromes, une glycine en position 1, 6, 23, 24, 29... On peut en déduire que ces aminoacides interviennent efficacement dans le fonctionnement ou l'établissement de la forme de la protéine; si l'un d'entre eux change par mutation, la molécule ne peut plus assurer sa fonction, la mutation est létale et le cytochrome modifié n'apparaîtra pas dans les cellules.

Les résidus variables constituent cependant une partie importante de la molécule, environ 77 aminoacides. Les résidus variables ne sont pas les mêmes dans toutes les espèces étudiées ; par exemple entre le cytochrome c d'un champignon, la levure de bière, et celui du cheval, 48 des 77 aminoacides variables sont différents; par contre chez des espèces relativement proches, comme le poulet et le canard, on ne trouvera que 2 acides aminés différents parmi ces 77 résidus variables. On peut donc, en comparant les séquences variables de molécules comme le cytochrome, *établir un degré d'homologie entre espèces*; or plus les espèces sont éloignées systématiquement, plus le degré d'homologie est faible. Si l'on admet que ces modifications sont le résultat de mutations ponctuelles survenues au cours de l'évolution, on dispose alors d'un marqueur permettant de déterminer le degré d'affinité entre espèces; c'est un outil de biologie moléculaire extrêmement important pour ceux qui veulent étudier l'évolution des organismes et déterminer les filiations qui existent entre eux.

Pourquoi cette importance de l'ordre d'enchaînement des aminoacides? Pourquoi un changement, minime en apparence, peut-il rendre une protéine inactive? Un premier élément de réponse peut être apporté si l'on considère les interactions qui se produisent entre résidus aminoacides, interactions qui conduisent à l'édification d'un agencement dans l'espace de la chaîne polypeptidique.

1.4. LA STRUCTURE SECONDAIRE

Comprendre les modalités d'établissement d'une structure secondaire implique de bien connaître les propriétés de la liaison peptidique.

A. *Particularités de la liaison peptidique*

L'analyse précise de cette liaison a été réalisée par PAULING et COREY entre 1940 et 1950.

Il existe deux possibilités de liaison entre le carbone et l'azote: la simple liaison C–N ou la double liaison C=N. Dans ces deux modes d'association, la distance séparant les deux atomes n'est pas la même: elle est plus faible dans la double que dans la simple liaison.

Or les mesures effectuées par diffraction de cristaux protéiques ont montré que, dans la liaison peptidique, les atomes de carbone et d'azote étaient séparés par une distance supérieure à celle observée dans la double liaison mais inférieure à celle rencontrée dans la simple liaison. *La valeur obtenue est intermédiaire (fig. III-12).*

Cette liaison peptidique est en fait un hybride de résonance entre la simple et la double liaison. Si l'on considère une courte période, la liaison peptidique est sous forme simple pendant les 2/3 du temps *(fig. III-13, A)* et sous forme double le 1/3 restant *(fig. III-13, B)*:

Cela a deux conséquences importantes:

1) La liaison peptidique est une liaison stable qui nécessite pour être rompue environ 84 kJ/mole.

A	B	C
1,49 Å	1,32 Å	1,27 Å

Fig. III-12: Longueur des différentes liaisons entre C et N.

A) Simple liaison.
B) Liaison peptidique.
C) Double liaison.

A B

Fig. III-13 : Résonance de la liaison peptidique.
Elle est alternativement sous forme d'une simple liaison (A) et d'une double liaison (B).

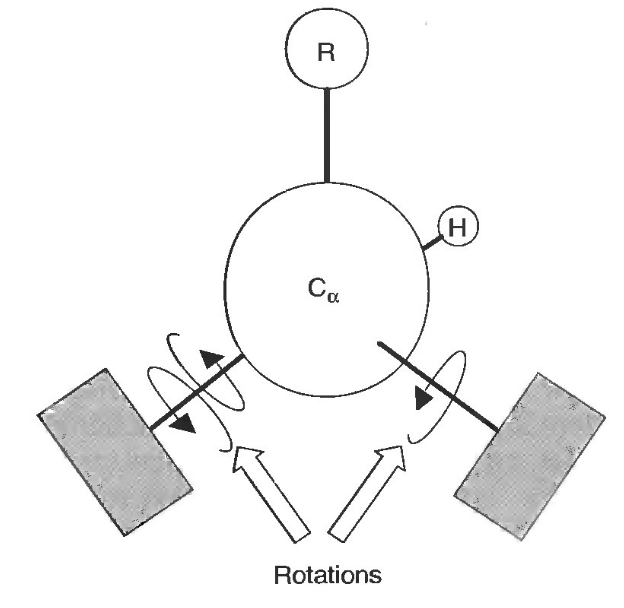


Fig. III-15 : Rotations autour du Cα.
Les rotations sont possibles de part et d'autre du carbone asymétrique : entre Cα et azote de la fonction amine d'une part, entre Cα et carbone de la fonction acide d'autre part.

2) La double liaison partielle interdit toute rotation entre C et N ; les 4 atomes entrant dans cette liaison, le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote sont situés dans le même plan : *la liaison est coplanaire,* ***elle est indéformable*** *(fig. III-14).*

B. Les différents types de structures secondaires

Les études cristallographiques et les diagrammes de diffraction des rayons X révèlent qu'il existe une certaine périodicité dans cette structure.

La réalisation de modèles, établis en tenant compte des possibilités de rotation autour du carbone *(fig. III-14 et 15)*, montre l'existence d'un nombre relativement restreint d'agencements de la chaîne polypeptidique ; deux sont particulièrement bien représentés dans les molécules protéiques, ce sont **l'hélice α** et **le feuillet β**.

a. L'hélice α

Dans cette structure, proposée par PAULING et COREY en 1951, la chaîne polypep-

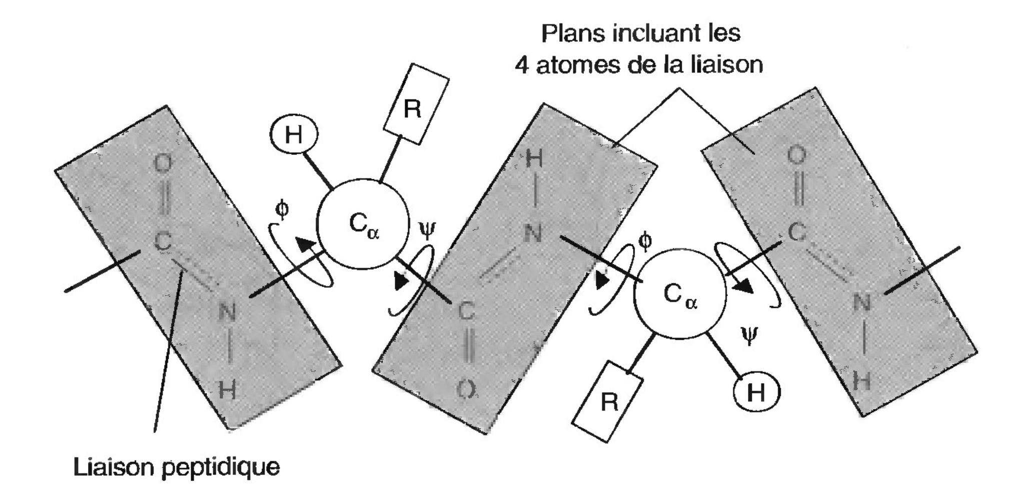


Fig. III-14 : Liaisons peptidiques successives.
La position des quatre atomes, azote (N) – carbone (C) – oxygène (O) – hydrogène (H), est fixe ; ils sont situés dans un même plan. La liaison entre le Cα et le C de la fonction acide est la liaison *psi* (ψ), celle entre le Cα et l'azote de la fonction amine est la liaison *phi* (φ).

tidique s'enroule autour d'un axe en une hélice dextrogyre, à la manière d'un ressort à boudin *(fig. III-16)*.

Cette hélice est constituée par les plans successifs des liaisons peptidiques, faisant entre eux un angle de 80° environ et formant en quelque sorte la paroi d'un cylindre creux. L'articulation entre deux plans résulte des rotations autour du carbone α.

Le pas de l'hélice est de 5,4 Å avec 3,6 résidus par tour. Ces dimensions très précises permettent le maintien de la structure hélicoïdale : en effet, en raison du rapprochement des aminoacides, introduit par cette disposition spatiale, ***des liaisons H peuvent s'établir entre l'oxygène du groupe carboxyle de l'acide aminé n*** (engagé dans une liaison peptidique) ***et l'hydrogène du groupe amine*** (lui aussi engagé dans une liaison peptidique) ***de l'acide aminé n+4*** *(fig. III-16)*. Ces liaisons H, *nombreuses*, interdisent les rotations autour des carbones : **la structure est stabilisée.**

Deux points sont à souligner.

1) Cette structure secondaire s'établit *à partir d'un seul polypeptide*.

2) *Tous les résidus*, c'est-à-dire les radicaux d'acides aminés, *sont situés à l'extérieur de l'hélice*. Quel que soit leur encombrement, ils ne gênent pas l'enroulement du polypeptide **et, surtout, les différentes propriétés qu'ils possèdent (polarité, charge...) pourront se manifester à l'extérieur de l'hélice.**

b. Les feuillets plissés β

Cette structure secondaire résulte de l'agencement de chaînes parallèles où la rotation autour des carbones α est beaucoup plus faible. Elle peut résulter de l'association de chaînes polypeptidiques différentes, disposées de manière parallèle ou antiparallèle, ou du reploiement d'une seule chaîne polypeptidique *(fig. III-17)*.

L'association parallèle des chaînes (ou de la chaîne repliée) est maintenue par de *nombreuses liaisons hydrogène perpendiculaires aux axes d'élongation des molécules (fig. III-18)*, établies entre atomes d'oxygène et atomes d'hydrogène *engagés, là encore, dans des liaisons peptidiques.*

Les chaînes sont disposées parallèlement, en zigzag, les replis s'effectuant au niveau des carbones α ; *les radicaux des acides aminés sont disposés alternativement au-dessus et au-dessous du plan général du feuillet (fig. III-19)*.

Les plans fixes formés par les liaisons peptidiques de chaque chaîne se trouvent au même niveau, et *on peut en schématiser*

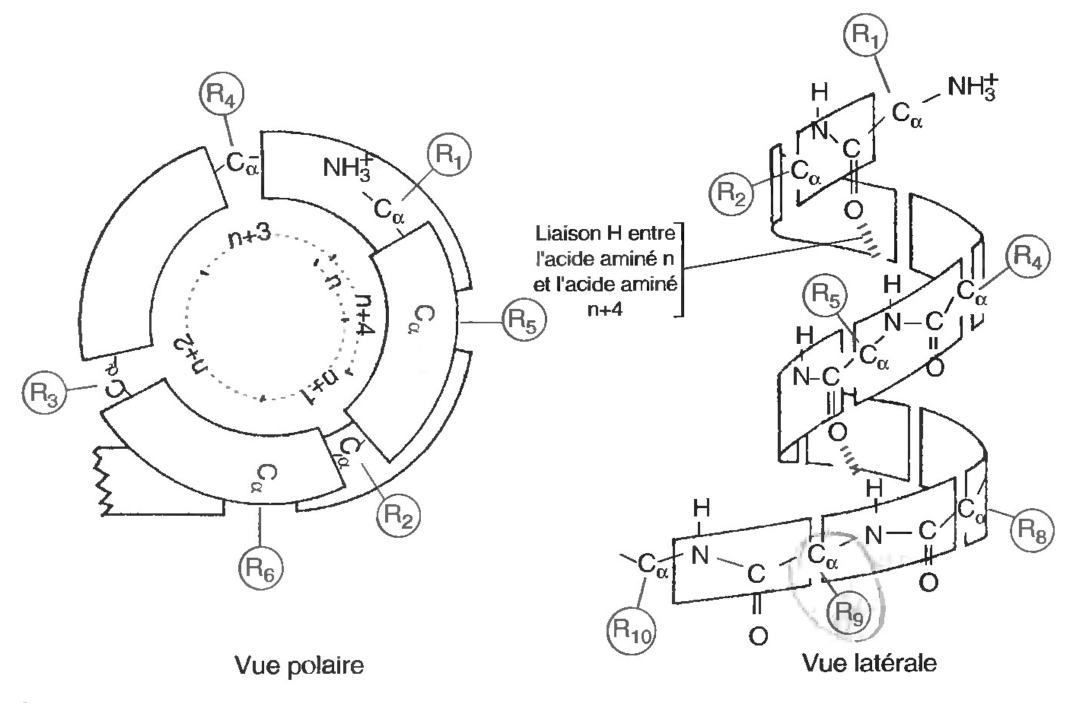


Fig. III-16 : Hélice α.

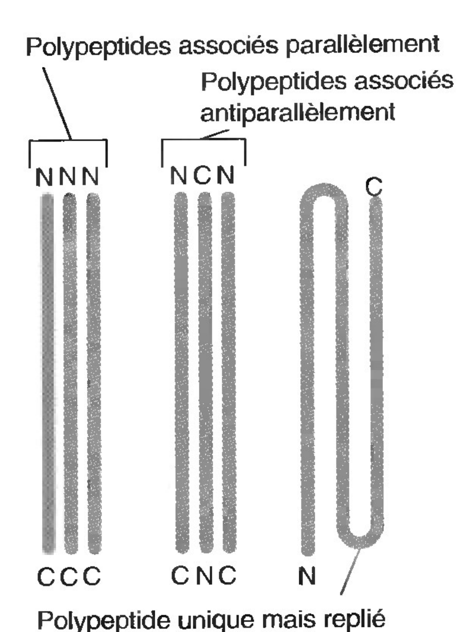


Fig. III-17 : Différents modes d'associations de chaînes polypeptidiques en feuillets.

l'aspect général comme celui d'une succession de lames formant entre elles un angle relativement important, à la manière de ces toitures que l'on peut observer au-dessus de certains ateliers.

C. La stabilité de la structure secondaire

La structure secondaire correspond donc à un agencement de la chaîne d'acides aminés en une forme géométrique déterminée par les liaisons faibles établies entre groupements carboxyle et amine (engagés dans des liaisons peptidiques) d'aminoacides relativement proches.

La régularité de cet agencement peut être perturbée par plusieurs facteurs.

a. Facteur d'ordre structural

Un acide aminé, *la proline*, ne présente pas l'organisation habituelle puisque c'est une molécule cyclique où le groupement amine participe à la formation du cycle *(fig. III-20)*. Lorsque cet acide aminé est intégré à une chaîne polypeptidique, il ne peut pas établir, avec ses voisins, le même type de relation qu'un aminoacide classique.

Il y a alors deux modifications importantes qui vont perturber la structure secondaire :

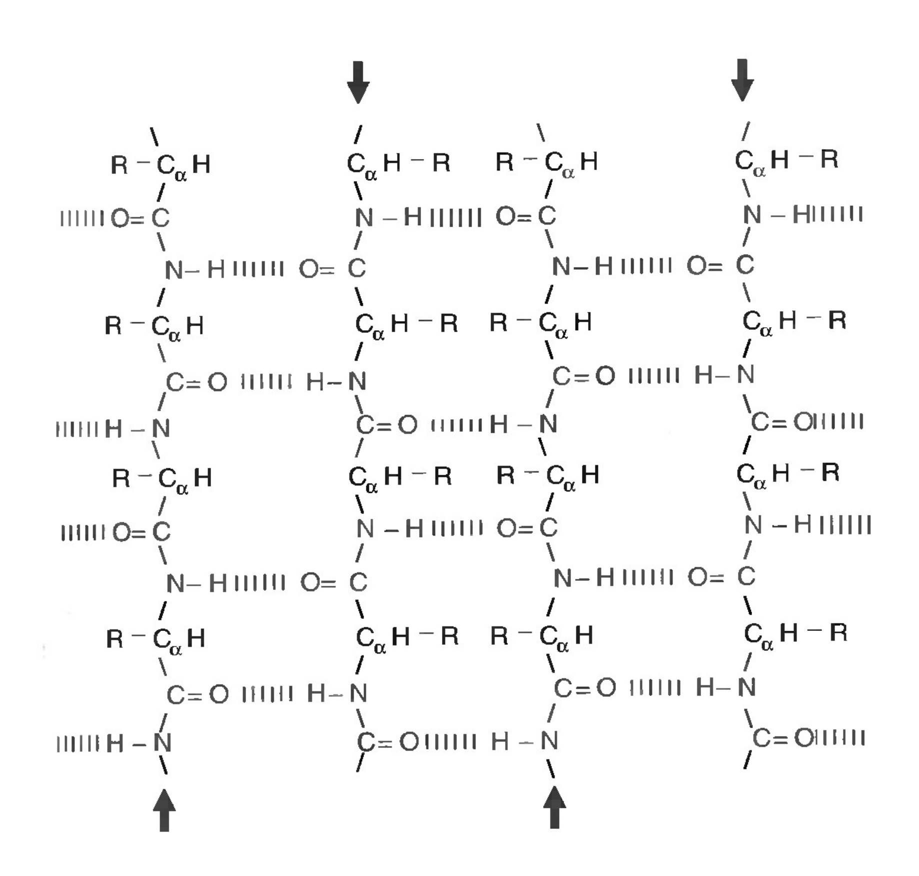


Fig. III-18 : Associations latérales, par des liaisons H, des chaînes polypeptidiques constituant des feuillets (les liaisons peptidiques sont représentées en rouge ; les flèches indiquent l'orientation des chaînes antiparallèles).

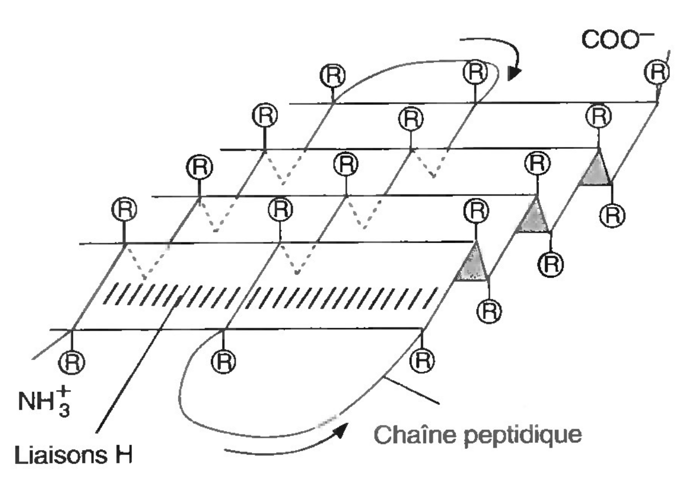


Fig. III-19 : Disposition des radicaux (R) par rapport aux polypeptides associés en feuillets β.

A

H_2C——CH_2
H_2C CH–$COOH$
N
H

B

H_2C——CH_2 H
H_2C CH–C N $C\alpha H$ vers C-terminal
N O R_{n+2}
C=O
R_n—$C\alpha H$
N–H
vers N-terminal

Fig. III-20 : Proline (A) et modification introduite par cet aminoacide dans l'orientation des polypeptides (B).
Les flèches rouges indiquent la position des liaisons peptidiques.

1) Formation d'un angle brutal qui rompt la structure hélicoïdale ou celle du feuillet plissé.
2) Au niveau de l'azote il n'y a plus d'hydrogène, celui-ci ayant été éliminé au moment de la formation de la liaison peptidique ; en conséquence, il n'y a pas de liaison hydrogène possible.

b. Rupture des liaisons hydrogène

La structure secondaire étant maintenue par des liaisons H, la destruction de celles-ci la désorganise : il y a **dénaturation**.

Celle-ci peut être obtenue par plusieurs voies :
1) *La chaleur* qui, en augmentant l'agitation thermique, rompt les liaisons faibles.
2) L'introduction d'un *agent chimique*, dit *dénaturant*, qui peut établir très aisément des liaisons H avec l'environnement, notamment avec les groupements engagés dans la liaison peptidique. L'exemple le plus classique d'agent dénaturant est la molécule d'*urée.*

H_2N
C = O
H_2N Urée

3) Le pH qui en modifiant la concentration en ions H^+ charge les aminoacides ionisables comme la lysine, l'arginine, l'acide glutamique... Lorsque ces molécules sont nombreuses et rapprochées au sein du polypeptide, elles ont alors tendance à se repousser ou s'attirer, introduisant des contraintes susceptibles de rompre les liaisons faibles maintenant l'hélice α ou le feuillet β.

D. La structure secondaire dans les protéines

Sur les schémas, on représente conventionnellement les feuillets plissés par des flèches orientées vers l'extrémité C-terminale et les hélices α, soit par des hélices, soit par de courts cylindres *(fig. III-21)*.

Un long polypeptide peut ne pas adopter, d'une extrémité à l'autre, la même structure secondaire. On peut avoir ainsi une succession d'hélices α et de feuillets β séparés les uns des autres par des portions de polypeptide plus ou moins déployées. Ces zones lâches peuvent avoir un tracé relativement souple mais elles peuvent aussi se présenter sous forme de coudes assez serrés stabilisés par des liaisons H entre le C=O (engagé dans une liaison peptidique) d'un acide aminé n et le N–H (lui

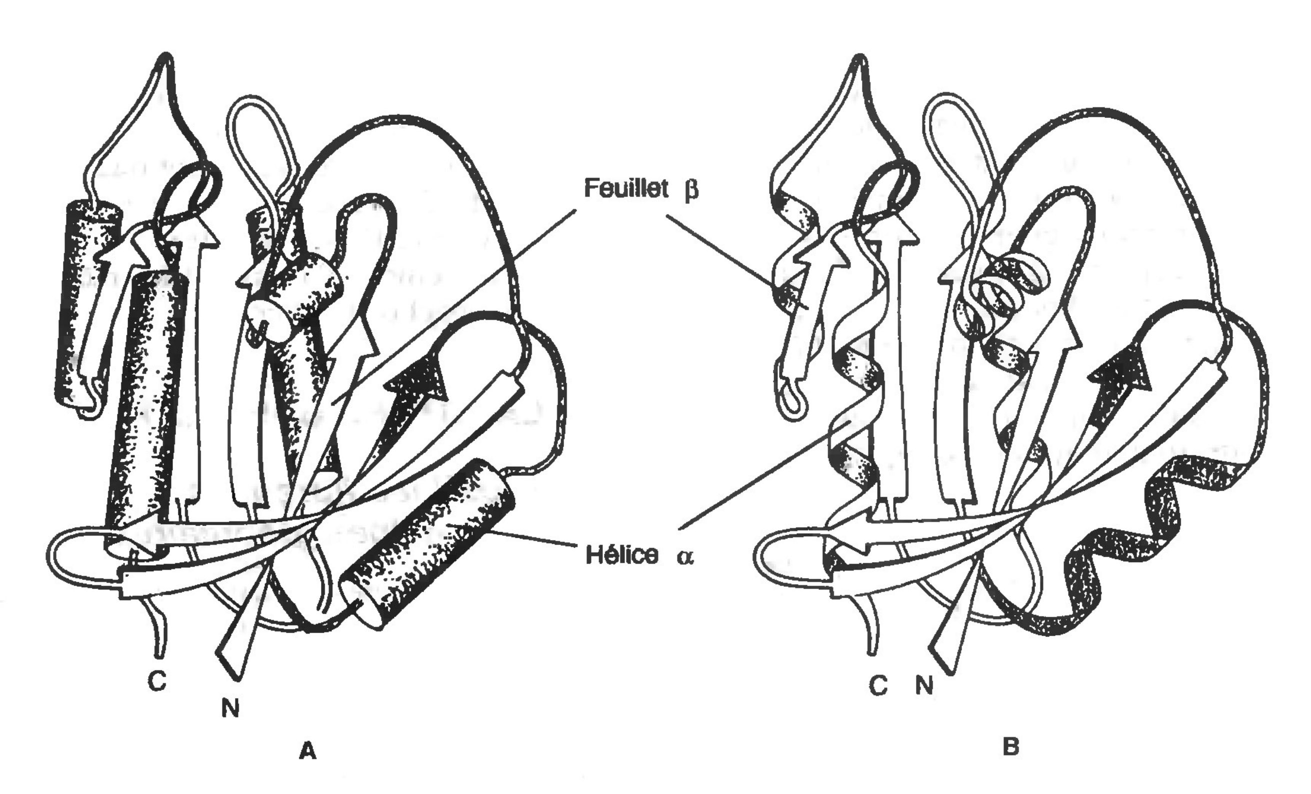


Fig. III-21 : Deux modes de représentation conventionnelle des hélices α et des feuillets β.

aussi engagé dans une liaison peptidique) de l'acide aminé n + 3 *(fig. III-22)*.

Grâce aux régions déployées, *les boucles*, l'ensemble présente alors une certaine souplesse, ce qui permet l'établissement d'un agencement moléculaire d'ordre supérieur, résultant de l'interaction de résidus d'acides aminés appartenant à des structures secondaires différentes : on parle alors de *structures super-secondaires* constituant ***les motifs***.

E. Les motifs

Le nombre relativement restreint de structures secondaires rencontré dans les protéines a une conséquence immédiate : leurs associations ne pourront donner lieu qu'à un nombre limité de motifs. On en a défini plusieurs en fonction des structures secondaires associées, de leur nombre et de leur agencement dans l'espace.

Ainsi, deux feuillets β parallèles réunis par une hélice α forment le motif β-α-β *(fig. III-23, A)*, celui dit « en épingle à cheveux » résulte de l'association de deux feuillets antiparallèles *(fig. III-23, B)*, celui baptisé « motif grec » correspond à la disposition antiparallèle de quatre feuillets β *(fig. III-23, C)*. Ces exemples de motifs sont relativement simples mais il peut en exister de plus complexes en raison du nombre élevé de structures secondaires participant à leur édification et de leur disposition dans l'espace.

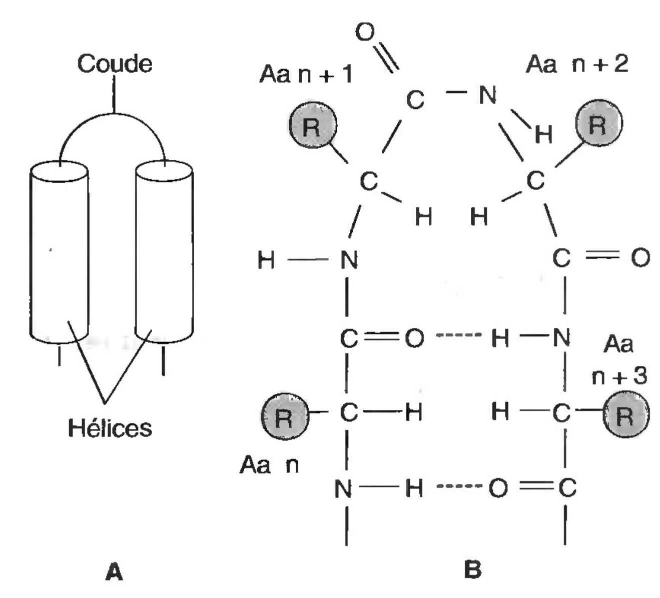


Fig. III-22 : Formation d'un coude dans une protéine (les liaisons hydrogènes sont en rouge).

Souvent, dans les protéines assurant une même fonction, on rencontre le même motif. Ainsi, dans la calmoduline et dans la troponine musculaire, qui sont deux protéines liant le calcium, on trouve, en plusieurs exemplaires, un motif commun formé par deux hélices α disposées de manière orthogonale et associées par une boucle *(fig. III-23, D)*; c'est au niveau de la boucle de ce *motif hélice-boucle-hélice*, constituée par 12 résidus d'acides aminés, que se fixe le calcium. Nous rencontrerons d'autres exemples de motifs fonctionnels, notamment ceux qui permettent l'association de protéines régulatrices à la molécule d'ADN (voir p. 258).

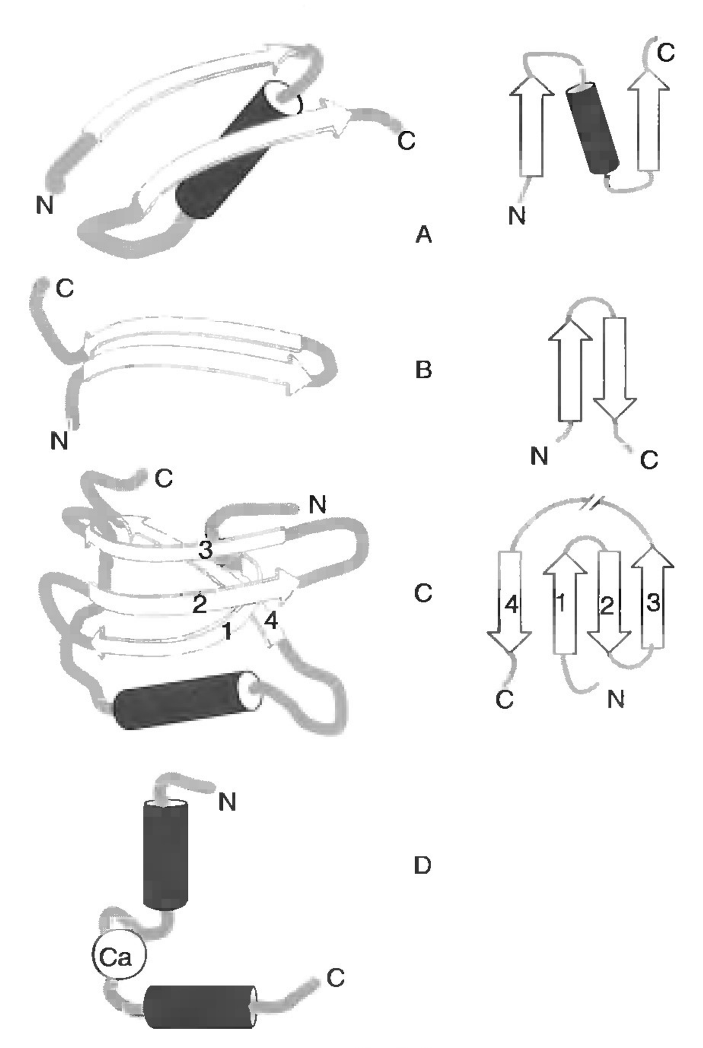


Fig. III-23: Quelques motifs fréquemment rencontrés dans les protéines.

A) Motif β-α-β, organisation tridimensionnelle et interprétation dans un plan.

B) Motif « en épingle à cheveux », organisation tridimensionnelle et interprétation dans un plan.

C) Motif grec, organisation tridimensionnelle et interprétation dans un plan. Entre les feuillets 3 et 4 la boucle peut être plus ou moins longue et posséder une forme d'organisation non intégrée au motif.

D) Motif de liaison au calcium.

Il ne faut pas croire cependant que tous les motifs sont liés à une fonction spécifique; le motif grec, que l'on rencontre très souvent dans les protéines, n'a pas, en lui-même, un rôle fonctionnel particulier.

1.5. LA STRUCTURE TERTIAIRE

A. Protéines fibreuses et protéines globulaires

Des polypeptides à structure secondaire homogène, sous forme d'hélices α ou de feuillets β, peuvent s'associer parallèlement et constituer des protéines jouant un rôle structural important; ce sont les *protéines fibreuses* comme par exemple la kératine des poils et des ongles (hélices α), la fibroïne de la soie (feuillets plissés β) ou la fibre de collagène (formée par l'association complexe d'hélices, différentes de l'hélice α).

Les polypeptides peuvent aussi prendre une configuration qui comporte des zones constituées par une succession d'hélices α et de feuillets β indépendants et d'autres formées par l'association de nombreux motifs; entre ces régions, plus ou moins bien définies, il existe des zones plus lâches au niveau desquelles s'effectuent d'importants changements d'orientation de la chaîne polypeptidique: ce sont les *protéines globulaires*.

Ces reploiements rapprochent des portions de polypeptides, qui sont sous forme d'hélices et de feuillets, et permettent ***l'établissement de liaisons entre les radicaux aminoacides très éloignés les uns des autres***, si l'on considère seulement leur position par rapport au N-terminal.

B. Liaisons maintenant la structure tertiaire

Les liaisons qui s'établissent entre ces radicaux sont de plusieurs types *(fig. III-24)*:

1) Des liaisons covalentes dont la plus importante est la *liaison disulfure* (ou *pont*

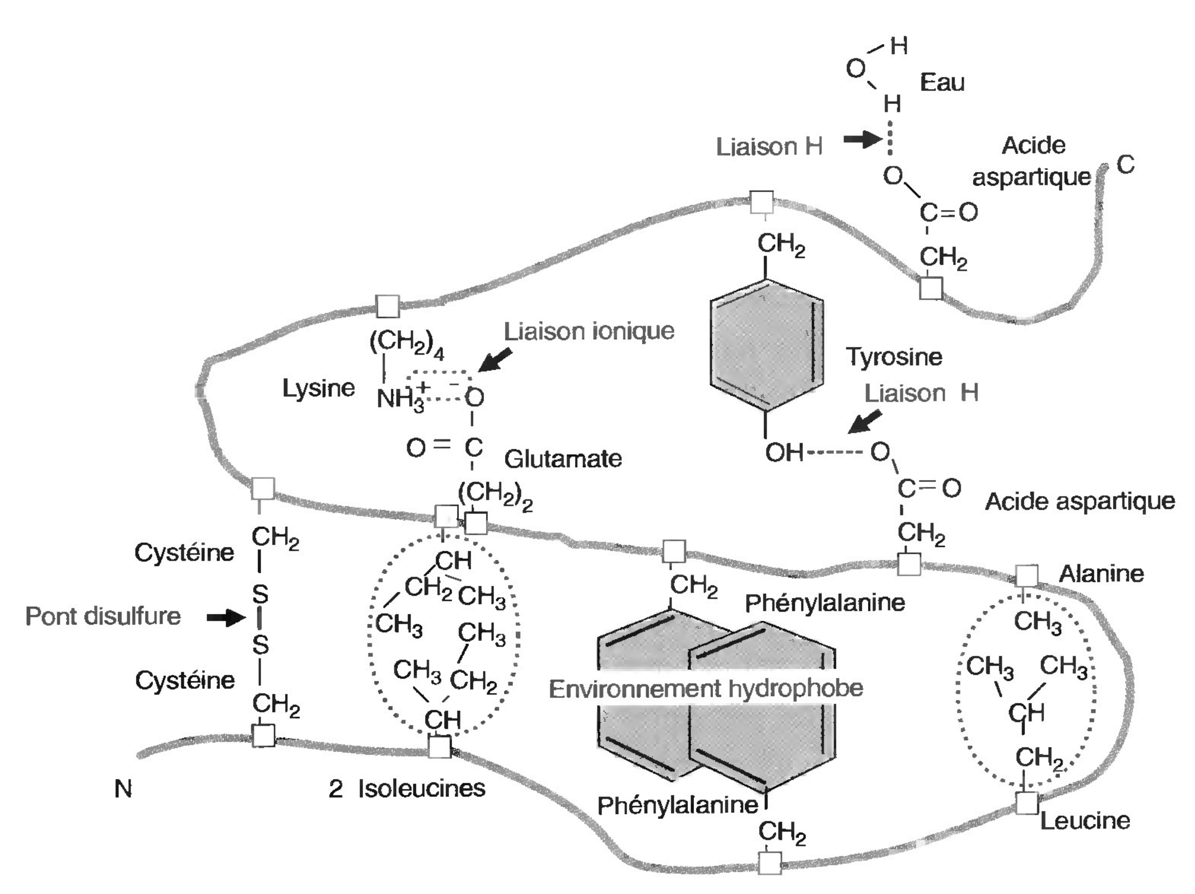
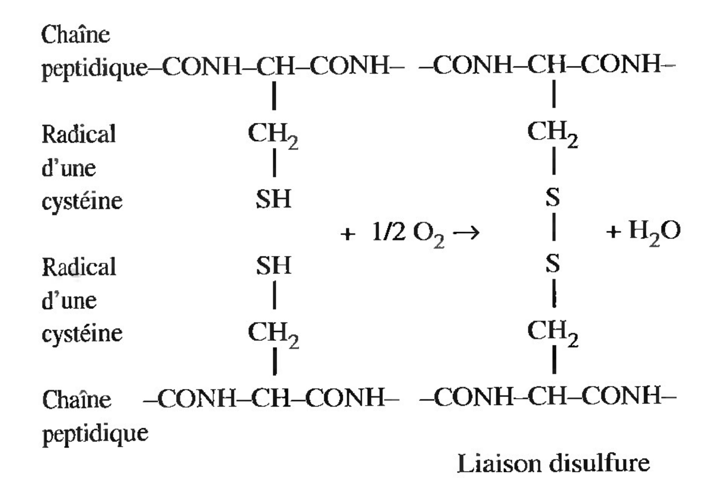


Fig. III-24 : Différentes liaisons intervenant dans l'établissement de la structure tertiaire.

disulfure), établie entre *deux cystéines* rapprochées par les reploiements de la chaîne polypeptidique.



2) Des liaisons ioniques entre groupements chargés de signes contraires.

3) Des liaisons hydrogène.

4) Des attractions entre radicaux hydrophobes, s'attirant par répulsion vis-à-vis du solvant aqueux, maintenues par des interactions de Van der Waals.

À l'exception des ponts disulfure, ces liaisons sont faibles et facilement rompues ; elles peuvent aussi se reformer aisément. Prises individuellement, elles ne sont donc guère efficaces pour maintenir la protéine dans une forme déterminée. **C'est seulement parce qu'elles sont très nombreuses que cette forme est stable.**

La mise en place de ces multiples liaisons faibles, qui ne s'établissent qu'à très courte distance, implique *le rapprochement d'importantes surfaces polypeptidiques*, plaçant à proximité les uns des autres des aminoacides susceptibles de s'associer ; en d'autres termes, **ces surfaces moléculaires doivent être complémentaires.**

La forme de la molécule protéique dépend donc du nombre et de la nature des radicaux susceptibles d'établir des liaisons entre eux mais surtout de la position qu'ils adoptent les uns par rapport aux autres. Cette position est

essentiellement déterminée *par rapport à l'environnement aqueux*, c'est-à-dire qu'elle est fonction du nombre et de la répartition des liaisons que le polypeptide peut établir avec l'eau et les substances dissoutes. Deux exemples permettent d'apprécier le rôle de cet environnement.

1) Exemple des histones

Les histones sont des *protéines basiques*, riches en acides aminés cationiques (arginine et lysine), associées à l'ADN dans la chromatine des cellules eucaryotes (p. 173). Il en existe 5, H_1, H_{2A}, H_{2B}, H_3, H_4, qui ont des propriétés très voisines.

Ces protéines ont été séquencées, ce qui a permis de constater que les acides aminés chargés possèdent *une répartition dissymétrique*.

Si l'on considère deux histones peu différentes, H_{2A} ou H_{2B}, par exemple, qui comportent respectivement 129 et 125 aminoacides, on note que les acides aminés basiques, arginine et lysine, sont localisés essentiellement vers l'extrémité N-terminale et vers l'extrémité C-terminale, la portion médiane de la molécule contenant au contraire une majorité d'aminoacides apolaires *(fig. III-25, A)*. D'autres aminoacides particuliers, comme la proline, sont situés vers les extrémités N et C-terminales et exclus de la zone centrale. Dans l'environnement aqueux et au pH de la cellule, la conformation de la molécule est dictée par l'ordre de succession de ces aminoacides *(fig. III-25, B)*: la partie centrale, formée d'acides aminés apolaires, adopte une configuration globulaire (le cœur hydrophobe) où les hélices α et les feuillets β sont nombreux mais les extrémités N et C-terminales ont une structure désordonnée. Elles sont largement déployées dans le milieu puisque les structures secondaires ne peuvent s'organiser en raison de la présence de proline et que les nombreuses charges positives ont tendance à se repousser; de nombreuses liaisons H sont établies avec l'eau.

2) Exemple de la ribonucléase

La ribonucléase est une *protéine enzymatique* de 124 acides aminés qui hydrolyse l'acide ribonucléique (ARN).

Le séquençage de la molécule montre qu'il y a *8 cystéines* occupant les positions 26, 40, 58, 65, 72, 84, 95 et 110 *(fig. III-26, A)*. La molécule se trouve partiellement sous forme d'hélice α.

Lorsque cette ribonucléase est traitée par l'urée, agent dénaturant comme nous l'avons vu, les liaisons H sont rompues et seuls les ponts disulfure établis entre les cystéines sont maintenus. On peut rompre ces derniers par l'action d'un agent réducteur comme le β-mer-

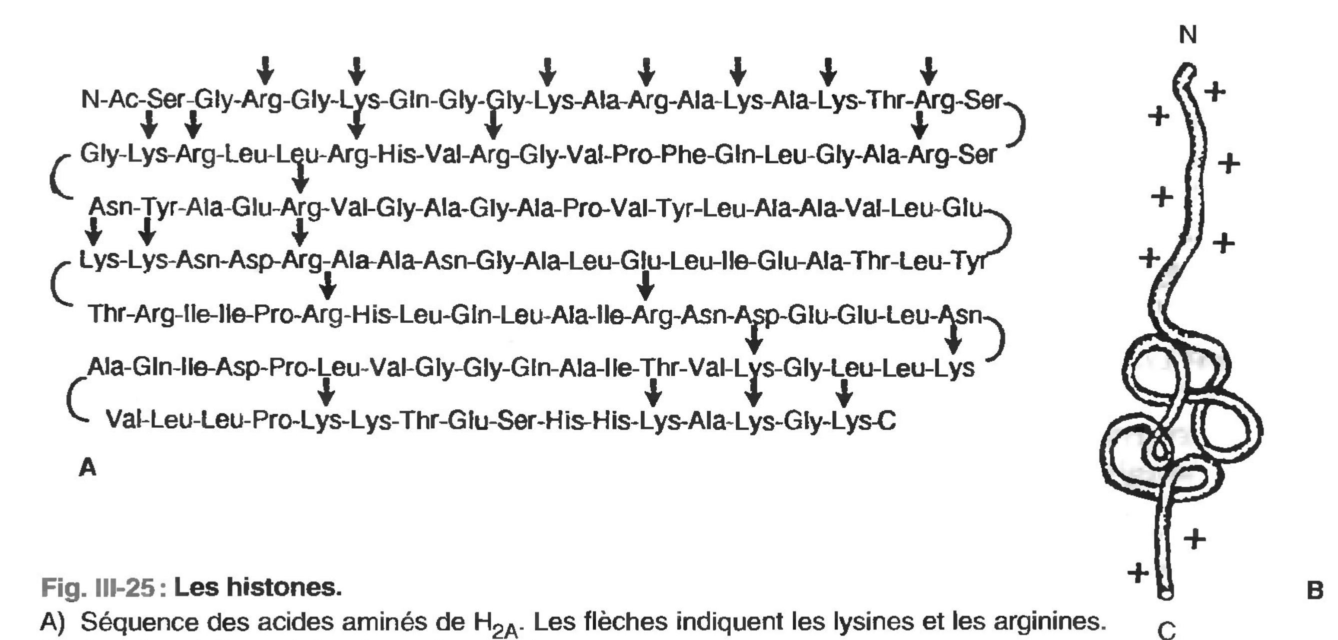


Fig. III-25 : Les histones.
A) Séquence des acides aminés de H_{2A}. Les flèches indiquent les lysines et les arginines.
B) Représentation schématique d'une histone.

captoéthanol. Lorsque les deux traitements sont associés, ribonucléase dans une solution de β-mercaptoéthanol et d'urée, la protéine est totalement déployée *(fig. III-26, B)* et, surtout, *dépourvue de toute activité enzymatique : elle n'hydrolyse plus l'ARN.*

Lorsque la protéine ainsi traitée est *dialysée* (voir p. 61), c'est-à-dire lorsque *l'urée et le β-mercaptoéthanol sont simultanément éliminés*, elle récupère progressivement son activité enzymatique.

La situation est par contre fort différente si le β-mercaptoéthanol est le seul à être retiré du milieu dans un premier temps, l'urée restant présente ; la protéine est réoxydée et seuls les ponts disulfure sont reformés. Dans un second temps on peut éliminer l'urée, la ribonucléase retrouvant dès lors un milieu « normal ». On constate cependant que seule une faible fraction de l'activité enzymatique, environ 1 %, est récupérée.

Pourquoi le résultat est-il différent lorsque la réoxydation, c'est-à-dire la reformation des ponts disulfure, est réalisée en présence d'urée ? La raison doit en être cherchée dans une reconstitution quelconque des ponts disulfure ; l'urée étant toujours présente, la protéine est déployée et les cystéines, qui sont suffisamment rapprochées pour que les liaisons S–S puissent se reformer, peuvent occuper dans le polypeptide une position quelconque *(fig. III-26, C)*. Or, statistiquement, pour former 4 ponts disulfure avec 8 cystéines, *il y a 105 solutions possibles, mais une seule permet à la protéine de recouvrer son activité enzymatique*. Dans cette expérience les liaisons S–S se sont donc reformées au hasard, ce qui démontre l'importance des liaisons faibles, non covalentes, dans l'établissement de la forme moléculaire.

Lorsque la molécule dénaturée est replacée dans un milieu dépourvu d'urée et de β-mercaptoéthanol, l'agitation thermique permet le rétablissement des contacts entre groupements susceptibles de s'associer par des liaisons H ou, si les acides aminés apolaires sont abondants, des interactions hydrophobes, ce qui confère à la protéine *une structure thermodynamiquement stable*, ***sa forme native*** ; les ponts disulfure n'interviennent que secondairement pour maintenir cette forme de la molécule ; ***la réalisation de celle-ci est d'abord le résultat d'interactions moléculaires faibles.***

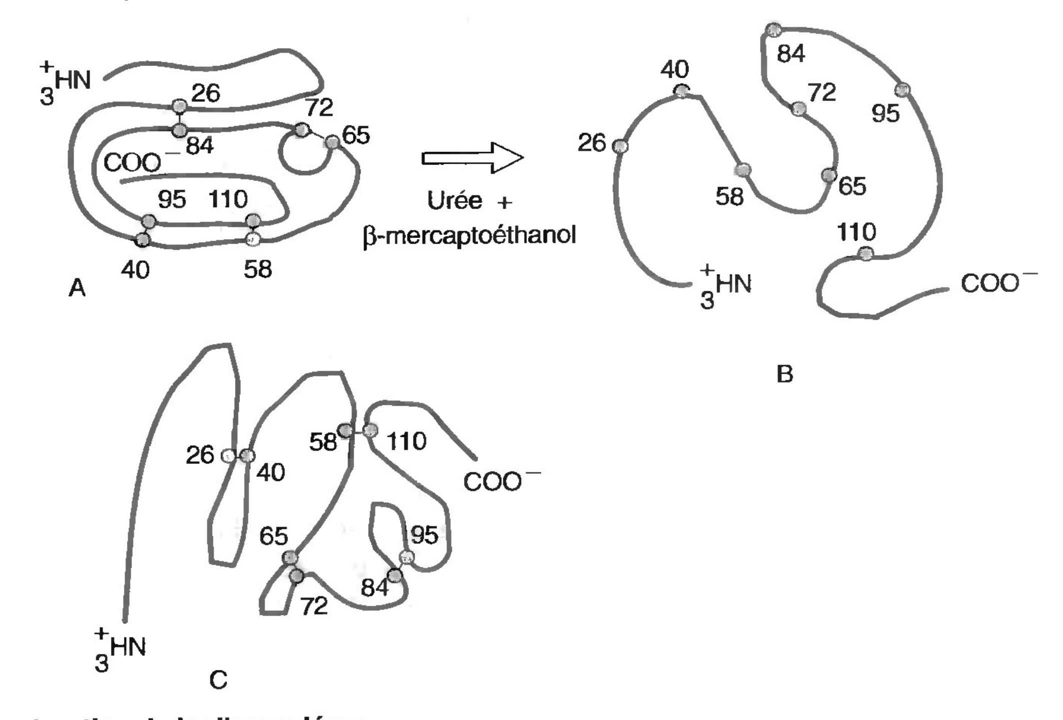


Fig. III-26 : Dénaturation de la ribonucléase.
A) Représentation schématique de la forme native.
B) Après dénaturation par l'urée et le β-mercaptoéthanol.
C) Reconstitution des ponts disulfure après élimination du β-mercaptoéthanol mais en présence d'urée.

On comprend mieux ainsi l'importance de la structure primaire dans le cas de l'hémoglobine et des cytochromes. Dans le cas de l'hémoglobine drépanocytaire, rappelons-le, il y a remplacement d'un acide aminé hydrophile, l'acide glutamique en position 6, par un autre hydrophobe, la valine. Ce changement modifie les propriétés de la partie externe de la molécule; lorsque celle-ci est désoxygénée, elle a la possibilité d'établir des liaisons faibles avec les molécules voisines, elles-mêmes porteuses de l'altération: il y a ainsi formation d'agrégats volumineux qui déforment les hématies. Dans les cytochromes, les invariants correspondent aux aminoacides occupant une position clef qui, soit permet le reploiement de la molécule, lui donnant sa forme, soit autorise une étroite association avec l'environnement (ici les constituants des membranes plasmiques dans lesquelles les cytochromes sont insérés).

En règle générale, lorsque la structure primaire d'une protéine, c'est-à-dire l'ordre d'enchaînement de ses aminoacides, est hautement conservée (avec très peu de changements) dans les différentes espèces ou les différents organites où cette molécule est rencontrée, ce n'est pas parce que les mutations ne s'y produisent pas; simplement, lorsqu'elles surviennent, elles entraînent la mort de l'organisme. On peut dès lors affirmer que la forme de la protéine joue un rôle essentiel dans la fonction qu'elle assure; il y a un étroit *rapport structure-fonction.*

La structure tertiaire correspond donc à l'arrangement natif particulier qui permet d'établir le maximum de contacts atomiques favorables avec l'environnement; c'est la disposition énergétiquement la plus favorable; c'est elle qui donne une forme dans l'espace, spécifique de chaque protéine; l'activité de celle-ci en dépend directement.

Il est théoriquement possible de déduire la forme de la molécule protéique de sa structure primaire (c'est-à-dire de l'ordre d'enchaînement de ses acides aminés). En effet, au niveau d'une liaison peptidique *(fig. III-14 et 15)*, les angles de rotations entre le carbone α et l'azote de la fonction amine (liaison *phi*, ϕ), d'une part, et entre le carbone α et le carbone de la fonction acide (liaison *psi*, ψ), d'autre part, ne sont pas quelconques: ils dépendent, surtout, en dehors des zones en hélices et en feuillets, de la nature des résidus. Toutefois, de très nombreux facteurs interviennent dans l'établissement des liaisons conduisant à la structure tertiaire et la prédiction des ***multiples dispositions favorisées*** (voir p. 28), possibles, est souvent difficile. L'utilisation conjointe de puissants ordinateurs et de méthodes d'analyses très précises (diffraction des rayons X, spectroscopie par résonance magnétique nucléaire par exemple), qui apportent des informations sur la disposition des atomes les uns par rapport aux autres et donc sur l'organisation spatiale des molécules, permet cependant d'obtenir de remarquables résultats.

C. La notion de domaine

Le long d'un même polypeptide, on trouve des organisations locales de la molécule dans l'espace, correspondant chacune à l'établissement d'une structure tertiaire particulière et bien définie, structurellement stable; on appelle **domaines** ces parties de molécules où *la structure spatiale* est parfaitement déterminée *(fig. III-27)*. Une petite protéine peut être constituée par un seul domaine; une grosse protéine peut en contenir plusieurs dizaines.

Ces domaines, que l'on peut considérer comme des formations de reploiement, correspondent à des unités fonctionnelles. Ils sont de longueur variable, comportant entre 40 et 100 résidus, parfois plusieurs centaines. Ils sont constitués soit par la juxtaposition de différents motifs, soit par une succession d'hélices α et de feuillets β, reliés les uns aux autres par des portions plus ou moins longues de la chaîne polypeptidique déployée. Ces portions déployées, qui correspondent aux changements d'orientation du polypeptide, sont souvent largement étalées à la surface du domaine, y constituant parfois de véritables protubérances *(fig. III-27, flèches)*; à leur niveau se trouvent généralement les acides aminés très réactifs qui sont responsables des propriétés fonctionnelles du domaine consi-

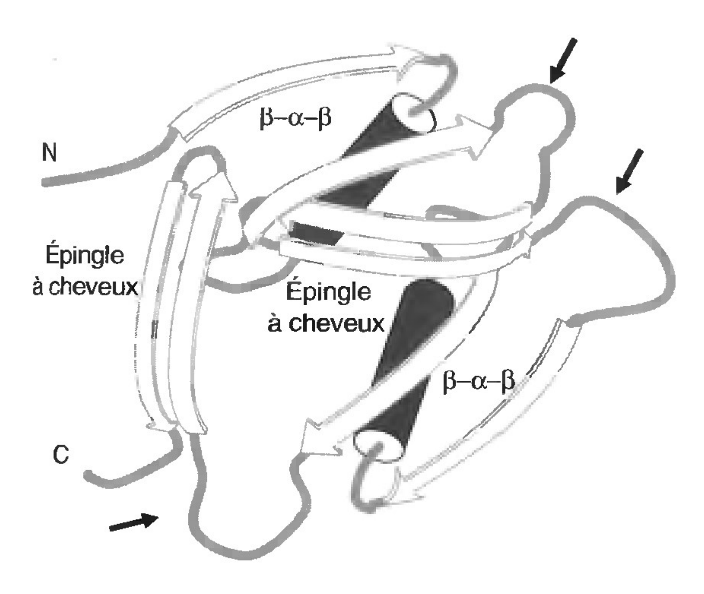


Fig. III-27 : Représentation schématique d'un domaine protéique constitué par l'association de deux motifs β-α-β et de deux motifs en « épingle à cheveux ».
Les flèches noires montrent les boucles de liaison largement étalées à la surface du domaine.

déré : activité enzymatique (voir p. 74), capacité de liaison à un complexe moléculaire (voir les anticorps p. 89).

On ne s'étonnera donc pas, dans ces conditions, que la plupart des protéines jouant un rôle biologique soient constituées par une suite de domaines ayant chacun une activité propre qui doit être prise en compte lorsque l'on étudie l'activité globale de la molécule. L'analyse structurale de protéines actives a montré que des molécules ayant des fonctions comparables sont constituées à partir de domaines sinon identiques, tout au moins fort comparables, comme si la cellule au cours de son évolution avait eu la possibilité d'associer des domaines déjà employés plutôt que d'en créer de nouveaux.

D. Les chaperons

Quatre-vingt-quinze pour cent des protéines adoptent dans la cellule leur conformation spatiale fonctionnelle. Compte tenu de la très grande sensibilité de la structure secondaire aux conditions du milieu, ce pourcentage est exceptionnel.

Bien que les protéines puissent, après dénaturation, se replier correctement, comme nous l'a montré ci-dessus l'exemple de la ribonucléase, cette réussite remarquable est surtout due à l'intervention de protéines qui ont été mises en évidence ces dernières années et que l'on nomme *les chaperons**.

La découverte de ces molécules a débuté lorsque de nombreux chercheurs se sont intéressés, il y a quelques années, au problème du *stress cellulaire*, c'est-à-dire à toutes les agressions potentielles (chocs thermiques, rencontre avec des composés toxiques, attaque par les virus...) que peut subir une cellule. Il est apparu que les cellules sont capables de répondre à ces agents « cytotoxiques » car elles synthétisent des protéines spécifiques, dites protéines de choc thermique ou **HSP** *(Heat Shock Proteins)*, ceci en raison de leur découverte au début des années 1960 par RITOSSA, un biologiste italien qui avait laissé une préparation de glandes salivaires de drosophiles sur un radiateur un peu trop longtemps ; on les nomme plutôt maintenant *protéines de stress*. En fait les découvertes de ces dernières années ont montré que ces protéines appartiennent à une famille de protéines ubiquitaires, très conservées, fabriquées en permanence par les cellules et présentes dans tous les compartiments cellulaires. Ce sont ***les protéines chaperons*** qui semblent intervenir à plusieurs niveaux :

– en s'associant à la protéine en cours d'élongation, elles stabilisent les conformations intermédiaires (voir p. 302) ;

– en permettant la remise en forme de protéines partiellement dénaturées ;

– en modifiant temporairement la conformation de protéines pour faciliter leur pénétration dans des organites (voir pores nucléaires, p. 185 et mitochondries, p. 332) par exemple.

Les cellules eucaryotes possèdent deux séries de protéines HSP, les HSP 70 et les HSP 60. Les HSP 70 interviendraient précocement, au moment de la synthèse protéique permettant à la molécule d'acquérir sa forme native ; les HSP 60 agiraient sur des protéines entièrement constituées, autorisant leur remise

* Ces protéines sont aussi appelées protéines chaperonnes.

CHAPERONS MOLÉCULAIRES ET CONFORMATION DES PROTÉINES

L'activité d'une molécule protéique dépend de sa structure tridimensionnelle. *In vitro*, un polypeptide déplié peut acquérir spontanément sa forme native et il paraît logique de penser qu'il en est de même *in vivo*, c'est-à-dire que l'établissement de la structure tertiaire et l'assemblage en protéine oligomérique (constituée par plusieurs sous-unités) sont réalisés sans catalyse et sans apport d'énergie, simplement à partir de l'information contenue dans la séquence des acides aminés.

Cette conception, qui prévalut très longtemps, fut remise en question à partir de 1980, lorsque LASKEY et ses collaborateurs ont montré que l'assemblage des histones pour constituer le nucléosome (voir la 2e partie, chap. II) nécessite l'intervention d'une autre protéine, *la nucléoplasmine*, qui joue le rôle de chaperon, c'est-à-dire *qu'elle accompagne les histones et aide à leur assemblage sans apporter d'information stérique.*

D'autres protéines jouant un rôle comparable furent rapidement découvertes et la notion de chaperon s'imposa progressivement.

Une protéine chaperon est une molécule qui permet le reploiement des protéines néosynthétisées, l'assemblage de protéines oligomériques, l'accompagnement de polypeptides pendant leur transport vers des compartiments en empêchant d'éventuelles associations indésirables. Elles ne font pas partie de la structure finale, mais en optimalisent la réalisation.

Des protéines, connues depuis plus longtemps, leur furent ensuite rattachées. Ce sont celles appelées **HSP** (***Heat Shock Proteins***) qui sont capables de resolubiliser les agrégats protéiques et qui jouent un rôle dans l'acquisition de la thermotolérance puisque, après un choc thermique, leur synthèse est stimulée ; les protéines de stress, qui constituent la réponse cellulaire à divers traumatismes (chimiques, physiques ou pathologiques), furent également incluses parmi les chaperons. Cette assimilation est justifiée par le fait que toutes ces protéines, qui sont des réponses cellulaires à une agression, permettent l'identification de protéines dénaturées ou anormalement repliées ; en effet, lorsqu'on injecte une protéine dénaturée à une cellule, elle synthétise des HSP.

Ces protéines chaperons consomment de l'énergie pour assurer le reploiement correct des polypeptides ; elles augmentent le rendement de cette opération mais n'en modifient pas la vitesse. Elles ne doivent pas être confondues avec des enzymes comme les peptidyl prolyl *cis-trans* isomérases (PPIase) qui modifient les liaisons entre la proline et d'autres acides aminés et qui sont également susceptibles de changer l'organisation tridimensionnelle de la protéine.

Les protéines chaperons sont très nombreuses et très diverses ; on les répartit en plusieurs groupes qui ont été, initialement, définis par la masse moléculaire.

Les HSP 100 (78 à 108 kDa) resolubilisent les agrégats protéiques et interviennent dans la thermotolérance.

Les HSP 90 (80 à 108 kDa) sont (avec les HSP 70) les plus exprimées après un stress. Elles s'associent à d'autres protéines pour former des complexes, notamment avec des facteurs de transcription ; elles interviennent alors dans la régulation de l'expression des gènes. Elles s'associent également aux protéines du cytosquelette (actine et tubulines).

Les HSP 70 (66 à 78 kDa), dont la structure est très conservée dans l'ensemble du monde vivant, sont les chaperons moléculaires intervenant dans la biogenèse des protéines, dans leur translocation entre compartiments cellulaires (mitochondries, noyau, réticulum endoplasmique) et dans le déshabillage des vésicules recouvertes.

Les HSP 60, associées à d'autres protéines, modifient la conformation des polypeptides et leur confèrent une structure tridimensionnelle fonctionnelle.

Les petites HSP (12 à 40 kDa) sont très hétérogènes et mal connues. Elles empêchent la constitution d'agrégats protéiques et protègent les molécules de la dénaturation ; elles ne consomment pas d'ATP, ce qui les distingue des autres chaperons.

Les modalités d'intervention de ces protéines sont, comme la diversité de leur rôle le laisse supposer, très diverses. Souvent, elles n'interviennent pas seules mais associées à d'autres protéines sous forme de complexes.

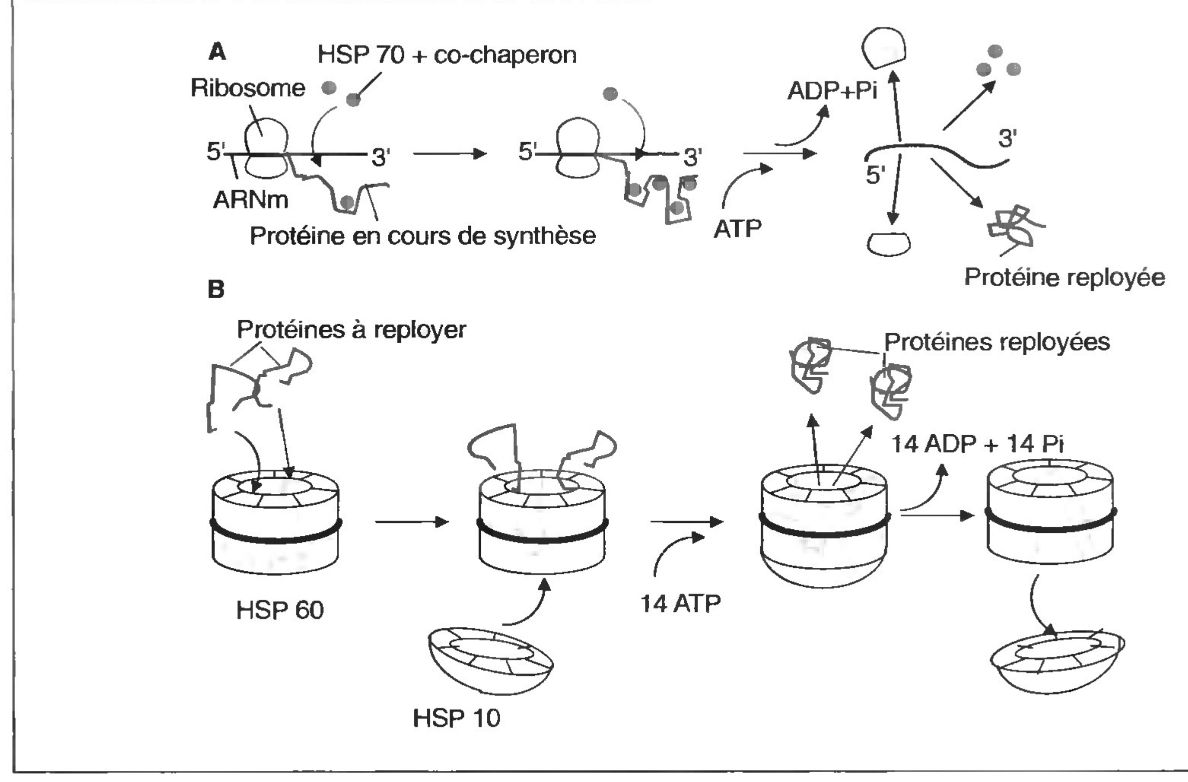
Les HSP 70 coopèrent avec d'autres protéines appelées co-chaperons, pour s'accoler aux protéines déroulées ou en cours de synthèse ; elles évitent qu'elles ne s'agrègent, précipitent ou se replient préma-

turément (voir schéma A, ci-dessous) puis, en utilisant l'énergie de l'ATP, elles les organisent dans une conformation spatiale déterminée. Leur rôle est particulièrement important au moment de la formation des complexes multiprotéiques car chacune des sous-unités adopte sa forme définitive seulement lorsqu'elle est en présence des autres constituants. Leur intervention est également primordiale lorsqu'un polypeptide pénètre dans un organite (voir la pénétration dans la matrice mitochondriale 2e partie, chap. VIII), car elles lui permettent de rester sous forme déroulée pendant toute la durée du transfert. Ce sont ensuite d'autres chaperons, les HSP 60, qui vont leur conférer la forme définitive.

Les HSP 60 fonctionnent de manière très différente; les modalités de leur intervention ont d'abord été comprises par l'étude de protéines bactériennes qui leur sont apparentées nommées GroEL. Ces HSP 60, parfois appelées *chaperonines*, sont des structures cylindriques constituées par l'association de deux anneaux formés chacun par 7 sous-unités de 57 kDa (voir schéma B, ci-dessous); au centre de ce cylindre se trouve une cavité de 5 nm de diamètre. Les protéines à replier pénètrent dans cette cavité par une extrémité; à l'autre extrémité vient se fixer un second complexe, la HSP 10 (appelée GroEs chez les bactéries), formé lui aussi par 7 sous-unités, qui ferme le cylindre. Quatorze molécules d'ATP sont alors hydrolysées, une pour chacune des sous-unités des HSP 60, ce qui libère le polypeptide de la paroi du cylindre et lui permet de se replier; la protéine quitte alors le complexe et la HSP 10 s'en dissocie.

Ces protéines sont codées par des gènes qui ont été très conservés au cours de l'évolution; elles conservent de nombreuses séquences homologues. Elles sont multigéniques, il y a de nombreuses isoformes, et chaque territoire cellulaire possède ses propres chaperons. Ainsi chez les Levures, on a dénombré 11 HSP 70, 6 dans le cytosol et le noyau, 3 dans la mitochondrie et 2 dans le réticulum. Une situation comparable est rencontrée chez les Mammifères et les Végétaux supérieurs.

La réalisation de la structure tridimensionnelle des protéines, bien que dépendante de la séquence des aminoacides la constituant, fait appel à des mécanismes complexes, encore en cours de décryptage, qui conditionnent le bon fonctionnement de la cellule.



en forme après dénaturation partielle ou leur changement de conformation lorsque celle-ci s'avère nécessaire (traversée d'un micropore, par exemple). Chaque compartiment cellulaire peut donc posséder ses HSP 60 propres.

1.6. LA STRUCTURE QUATERNAIRE

De très nombreuses protéines ne sont pas constituées par un seul polypeptide mais par l'association spécifique, par l'intermédiaire de

liaisons faibles, de plusieurs chaînes peptidiques *(fig. III-28)*; ces unités, identiques ou non, ont chacune une structure tertiaire bien définie; c'est leur association en une unité d'ordre supérieur qui confère à la protéine sa fonction biologique complète.

Cette association étant le fait de liaisons faibles, les sous-unités peuvent, le plus souvent, être facilement séparées par des solutions salines, des solutions acides ou l'urée. Ces dissociations sont souvent réversibles: si on supprime les réactifs, la protéine se reconstitue spontanément. Cette réassociation spontanée, qui ne nécessite aucun apport énergétique, suppose qu'il y ait *complémentarité des formes*; cette complémentarité permet la formation de multiples liaisons faibles assurant la cohésion de l'édifice: il y ***autoassemblage***.

De nombreuses protéines ont à l'état fonctionnel une structure quaternaire; des enzymes comme la thréonine désaminase ou la glutamate déshydrogénase en sont des exemples, la capside des virus en est un autre (voir p. 16).

La plus classique des protéines à structure quaternaire est l'hémoglobine qui comporte deux chaînes α et deux chaînes β *(fig. III-29)*, chacune de ces chaînes (ou protomères) posséd-

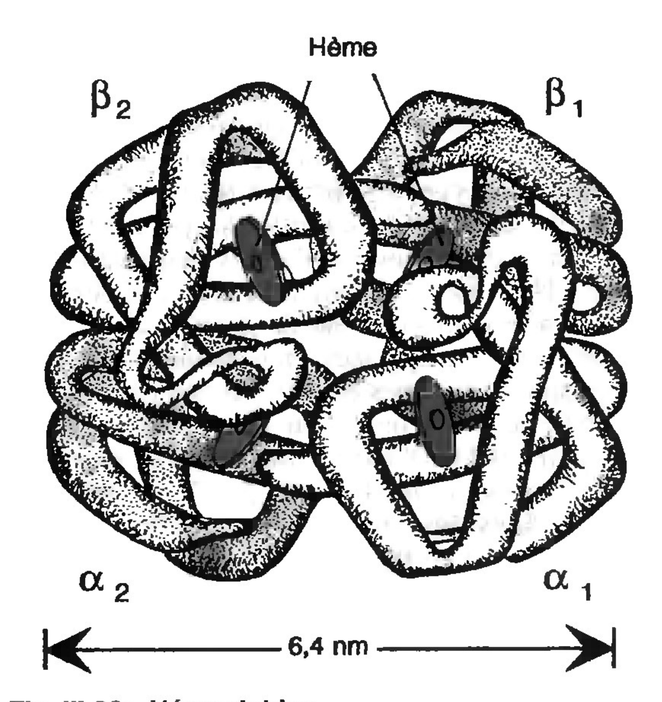


Fig. III-29: Hémoglobine.
Hétéroprotéine constituée par l'association de quatre polypeptides, deux chaînes α et deux chaînes β, chacune ayant une organisation très comparable à celle de la myoglobine.

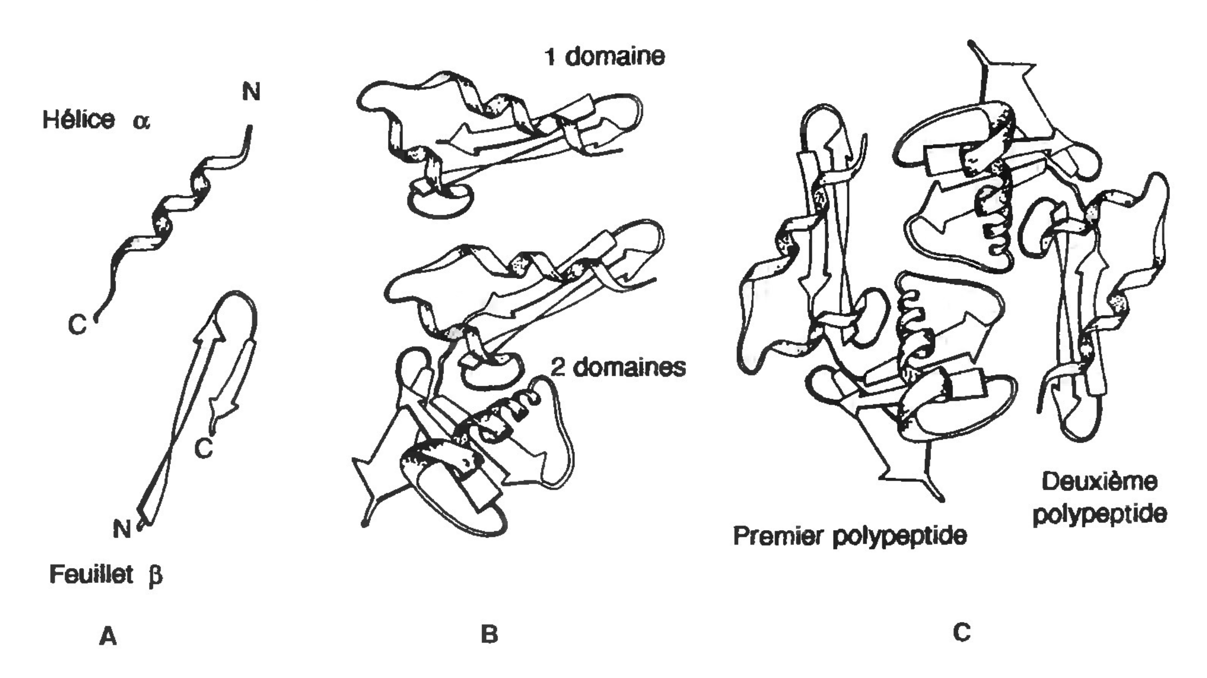


Fig. III-28: Principaux niveaux d'organisation des protéines.
A) Structure secondaire: hélice et feuillet.
B) Structure tertiaire: polypeptide à un domaine et polypeptide à deux domaines.
C) Structure quaternaire: deux polypeptides, chacun à deux domaines, sont associés par des liaisons faibles pour former la molécule protéique.

dant une organisation moléculaire très proche de la myoglobine *(fig. III-30)*, protéine pigmentaire qui, comme l'hémoglobine, fixe l'oxygène, mais dans le muscle.

La myoglobine, comme chaque chaîne α ou β de l'hémoglobine, fixe un oxygène grâce à une unité non peptidique, ***l'hème***: c'est le groupement prosthétique responsable entre autres de la couleur de la molécule*. L'hème lui-même comprend une partie organique, une protoporphyrine à quatre noyaux pyrrole, et un ion ferreux auquel se lie l'oxygène. Cet ion ferreux forme six liaisons *(fig. III-30)*: quatre avec les atomes d'azote de l'hème, une avec un acide aminé de la protéine, une histidine, et la sixième avec l'oxygène.

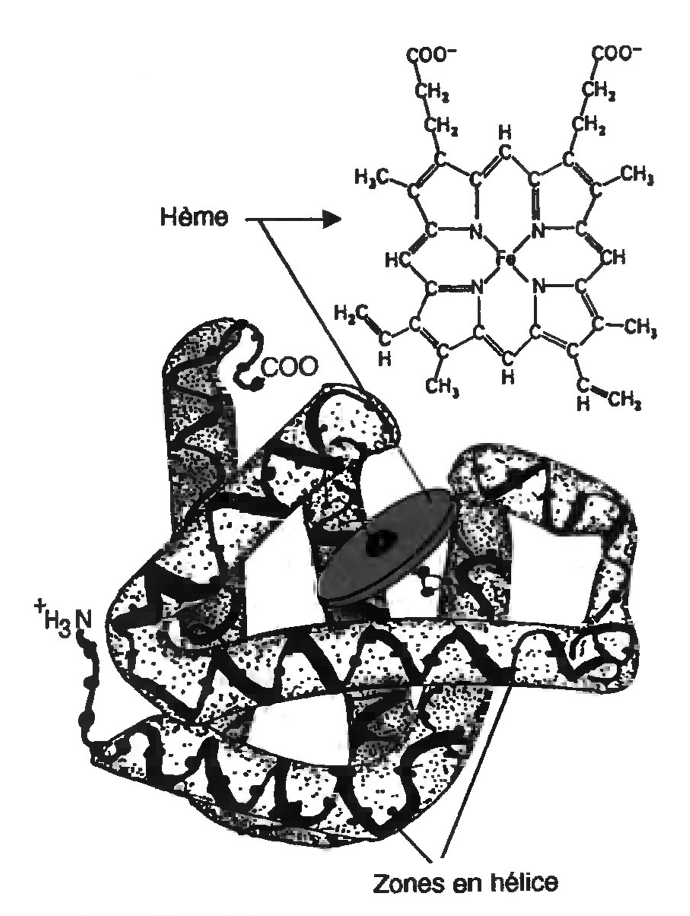


Fig. III-30: Myoglobine.
Hétéroprotéine en structure tertiaire: le polypeptide replié, en majorité sous forme d'hélice, est associé à une molécule d'hème; celle-ci, située dans une logette hydrophobe, possède un atome de fer susceptible de fixer l'oxygène.

C'est le polypeptide, *la globine*, qui, en créant un environnement spécial, évite le passage du fer de l'état ferreux (où il fixe l'oxygène) à l'état ferrique**. Dans la dépression de la molécule protéique où il est inclus, l'hème ne peut fixer l'oxygène que sur une seule de ses faces, ce qui autorise un transport réversible.

La formation et la dissociation du complexe hémoglobine-oxygène (Hb [O_2]) dépendent de la pression partielle du gaz. L'étude des courbes de saturation *(fig. III-31)* montre que la myoglobine a une plus forte affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine; la saturation de son site de fixation est en effet plus rapide pour une pression partielle plus faible.

Les courbes de saturation sont toutefois fort différentes: celle de la myoglobine est hyperbolique alors que celle de l'hémoglobine est sigmoïde; *pour une variation de pression relativement faible (de l'ordre de 40 mm de mercure)*

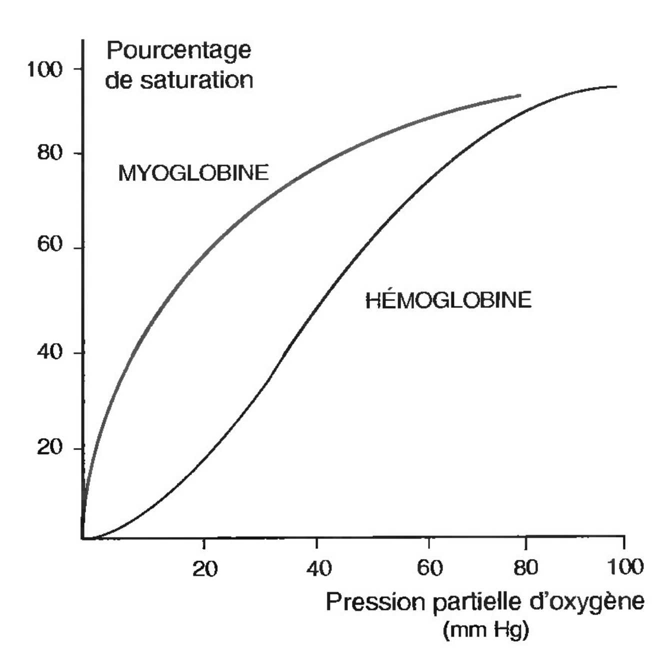


Fig. III-31: Courbe de dissociation de la myoglobine et de l'hémoglobine en fonction de la pression d'oxygène.

* De très nombreuses autres protéines doivent leur activité à un groupement prosthétique.

** Nous avons vu p. 43 que dans les cytochromes, le fer de l'hème fixe les électrons et non l'oxygène. C'est la protéine à laquelle est lié le groupement prosthétique qui est responsable de ces propriétés différentes.

l'hémoglobine est donc susceptible de fixer ou de céder l'oxygène. Aux pressions physiologiques régnant dans les alvéoles pulmonaires et dans les tissus, l'hémoglobine est un transporteur plus efficace que la myoglobine qui, dans le muscle, sert plutôt de réservoir d'oxygène.

Ceci est dû à un effet coopératif des 4 chaînes, c'est-à-dire à la mise en place d'une structure quaternaire; en effet si l'hémoglobine est dénaturée, chaque chaîne se comporte comme la myoglobine. On peut dire, sans entrer dans le détail des mécanismes moléculaires, que la libération de l'oxygène, [Hb (O_2) donnant Hb], d'une seule sous-unité s'accompagne d'une déformation de la molécule: les deux chaînes α gardent la même position, mais les deux chaînes β s'éloignent l'une de l'autre *(fig. III-32)*. Ce déplacement, qui intéresse des régions éloignées de celle où s'est produite l'interaction initiale *(fig. III-33)*, est appelé *transition allostérique;* il favorise la libération de l'oxygène par les trois autres chaînes polypeptidiques; l'oxygénation provoque le mouvement inverse, accélérant la fixation du gaz. Ces changements de conformation moléculaire, modifiant de manière très importante l'affinité des hèmes pour l'oxygène (jusqu'à 200 fois), sont la conséquence de l'organisation en structure quaternaire; cette dernière confère d'ailleurs d'autres propriétés à l'hémoglobine (transport de H^+, de CO_2...) qui en font une molécule remarquablement adaptée à sa fonction.

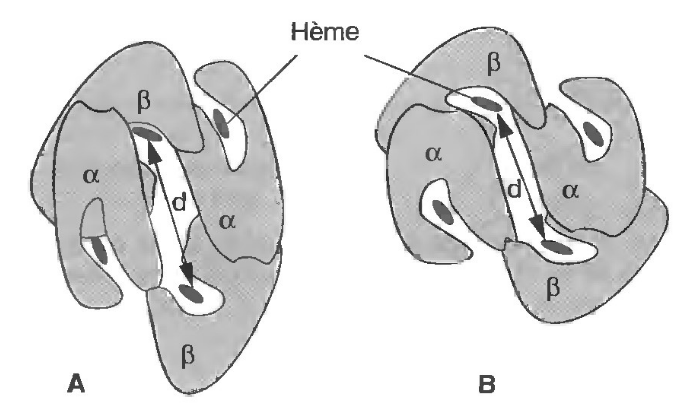


Fig. III-32: Modification de la conformation moléculaire de l'hémoglobine.

A) Configuration déchargée, sans oxygène; d = 40 Å.
B) Configuration active obtenue dès la fixation de l'oxygène; d = 33 Å.

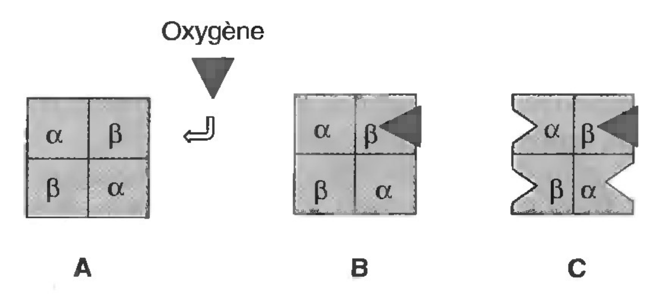


Fig. III-33: Interactions allostériques et fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine.

Représentation *très schématique* montrant comment la fixation d'un oxygène sur l'hémoglobine entraîne une modification de la conformation spatiale non seulement de la chaîne concernée mais également des trois autres; la fixation de l'oxygène est alors grandement facilitée.

1.7. ASSOCIATIONS ET CHANGEMENT DE CONFORMATION DES MOLÉCULES PROTÉIQUES

Les molécules protéiques peuvent s'associer entre elles, comme nous venons de le voir dans le cas de l'hémoglobine, ou avec d'autres molécules pour former des complexes: enzyme-substrat (voir p. 76), anticorps-antigène (voir p. 90), nucléoprotéines.

Cette aptitude à former des associations tient au fait que les protéines peuvent offrir des *surfaces complémentaires* de celles des molécules auxquelles elles se lient; au niveau de ces surfaces de *multiples liaisons faibles* (liaisons H, liaisons de Van der Waals) maintiennent l'association; la résistance de celle-ci est directement proportionnelle au nombre et la force des liaisons établies, c'est-à-dire, en fait, à la précision avec laquelle les molécules s'emboîtent l'une dans l'autre.

Très fréquemment cette association entraîne des modifications de la conformation de la protéine; ce changement dans l'organisation spatiale des molécules, induit par leur union *(fig. III-34, A et B)*, peut alors rendre possibles de nouvelles associations *(fig. III-34, B puis C)*, associations qui n'étaient pas possibles avant la mise en place de la première liaison.

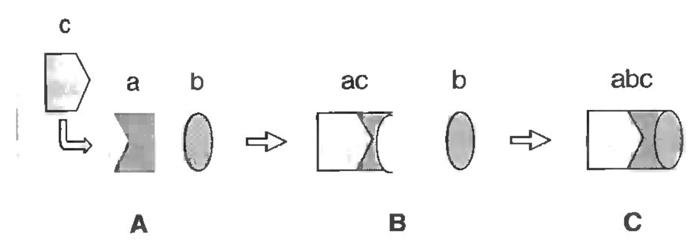


Fig. III-34 : Changement de conformation et activité des protéines.
La protéine *a* ne présente pas, à l'état natif, de surface permettant son association avec la molécule *b* (A) ; l'introduction dans le milieu d'une molécule *c*, qui possède une surface complémentaire de *a* permet la formation du complexe *ac* (B). La réalisation de celui-ci entraîne un changement de configuration spatiale de *a* qui possède dès lors une surface permettant son association avec *c* (B puis C).

Ces changements conformationnels, qui sont en fait des interactions entre sites différents et éloignés, sont qualifiés d'*interactions ou effets allostériques*. **Leur rôle en biologie est fondamental** : transduction d'un signal (voir p. 156), contraction musculaire (voir p. 274), transformation d'un substrat (voir p. 77)...

Les molécules protéiques doivent donc être considérées comme des édifices moléculaires complexes ; très diverses dans leur composition, ces molécules adoptent dans l'espace **une forme définie par les possibilités que l'environnement offre pour l'établissement de multiples liaisons faibles (stéréospécificité)**. Cette forme de la protéine, déterminée en fait par l'ordre d'enchaînement des acides aminés constitutifs, joue un rôle toujours fort important et conditionne sa fonction et ses propriétés physiologiques. La connaissance de leur composition et de leur organisation spatiale est donc indispensable pour explorer le fonctionnement cellulaire mais, étant donné leur taille et la nature des liaisons maintenant leur conformation, les protéines sont particulièrement fragiles et leur isolement dans un état aussi proche que possible de celui qu'elles présentent à l'état natif implique la mise en œuvre de méthodes particulières.

1.8. PURIFICATION, IDENTIFICATION ET ISOLEMENT DES PROTÉINES *

Comme nous l'avons vu, chaque protéine peut être identifiée par l'enchaînement particulier des acides aminés la constituant. Les protéines ont donc des structures tertiaires spécifiques et chaque espèce moléculaire possède des caractéristiques physico-chimiques qui lui sont propres ; leurs formes, leurs masses moléculaires, leurs charges ioniques et leur solubilité sont utilisées pour les séparer ou les purifier.

A. *Méthodes fondées sur les différences de solubilité*

La solubilité d'une molécule protéique dépend des interactions qu'elle établit avec le solvant : lorsqu'elles sont fortes, la protéine se disperse dans le milieu ; lorsqu'elles sont faibles, les interactions protéine-protéine dominent, il y a formation d'agrégats et précipitation.

Les protéines globulaires sont généralement solubles dans les solutions salines diluées alors que la plupart des protéines fibreuses ne le sont pas. Le sel neutre le plus fréquemment employé est le sulfate d'ammonium qui, très soluble dans l'eau, a une force ionique élevée.

Les protéines globulaires solubilisées deviennent insolubles lorsque la concentration en sel augmente : c'est le **relargage**. Celui-ci ne se produit pas à la même concentration pour toutes les protéines : certaines précipitent après une très faible augmentation de la teneur en sel alors que pour d'autres il faut qu'elle soit très élevée. On peut ainsi, par une méthode de **précipitation sélective**, séparer les différentes protéines d'un mélange.

B. *Méthodes fondées sur la taille des molécules protéiques*

La **dialyse** est une méthode de séparation des constituants d'un mélange faisant appel à *une membrane poreuse hémiperméable* placée entre deux compartiments ; les molécules ne pourront traverser cette membrane et diffuser dans le milieu que si le diamètre

* Nous tenons à remercier M. GROSBOIS et A. JOLLIOT-CROQUIN qui ont bien voulu relire ce chapitre.

des pores permet leur passage; ce diamètre est calculé de telle sorte que seuls les ions et les molécules d'une masse moléculaire préalablement définie circulent librement, les grosses molécules protéiques demeurant dans le compartiment d'origine. Par cette méthode, on peut donc purifier ou concentrer des protéines.

On place le mélange contenant la protéine à concentrer et les petites molécules contaminantes dans un tube, fermé aux extrémités *(fig. III-35)*, dont la paroi est constituée par la membrane elle-même (**boudin de dialyse**). L'ensemble est plongé dans un récipient contenant de l'eau ou une solution très diluée, souvent une solution tampon. Les petites molécules vont traverser aisément la membrane et, en vertu des lois de la diffusion, leur concentration sera rapidement égale dans les deux compartiments (le contenu du boudin et le milieu extérieur); par contre les protéines resteront à l'intérieur. En changeant plusieurs fois la solution du récipient, la teneur en petites molécules contaminantes diminue jusqu'à devenir négligeable alors que celle des protéines n'a pas changé.

La chromatographie de partage réalisée sur papier ou sur couche mince (voir p. 36) est utilisée pour séparer les petites molécules (oses, acides aminés); pour les plus volumineuses, dont les protéines, on emploie un autre type de chromatographie, la **chromatographie d'exclusion** *(fig. III-36)* dans laquelle des colonnes sont remplies de très petites billes poreuses (pores de 100 µm de diamètre par

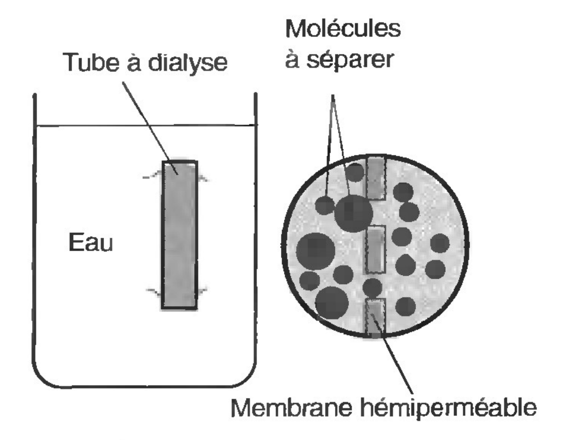


Fig. III-35: Dialyse.
Le mélange de protéines à concentrer est introduit dans un tube dont la paroi est constituée par une membrane hémiperméable. Ce tube est ensuite placé dans un récipient contenant une solution diluée. En vertu des lois de la diffusion passive, les concentrations ont tendance à s'équilibrer entre les deux compartiments. En conséquence, les molécules de petite dimension traversent les pores de la paroi et elles se dispersent dans l'ensemble du volume; les grosses molécules, dont la taille ne permet pas le passage à travers les pores, restent confinées dans le tube. Dans celui-ci, leur concentration augmente par rapport à celle des molécules plus petites.

exemple) faites de polymères insolubles mais riches en eau (dextrane, agarose...).

Le mélange contenant les molécules à séparer, dont le solvant constitue *la phase mobile*, est versé au sommet de la colonne (A); les petites molécules pénètrent dans les pores des billes et sont retenues alors que les plus grosses, entraînées par le flux de solvant, traversent rapidement et sont récupérées à la base (B). On verse ensuite (C) du solvant (élution), ce qui permet de récupérer les molécules plus petites dans l'ordre décroissant des masses moléculaires (D). Dans cette méthode, les billes jouent le rôle *d'un tamis moléculaire*.

Les macromolécules, comme tout objet soumis à la force d'attraction terrestre, sont attirées vers le fond du récipient dans lequel elles sont en suspension; c'est la *sédimentation*. Toutefois, la densité des molécules protéiques n'est que très légèrement supérieure à la densité du solvant et, par conséquent, leur vitesse de sédimentation est très lente. Pour accélérer leur déplacement dans le milieu on place le tube qui les contient dans une centrifugeuse réfrigérée tournant sous vide à grande vitesse (80000 tours/minute), les soumettant ainsi à une force centrifuge développant plusieurs milliers de fois l'accélération de la pesanteur (100000, voire 500000 *g*): c'est l'**ultracentrifugation** *(fig. III-37)*.

Les particules (ou les molécules), réparties au départ de manière uniforme, vont se déplacer vers le fond du tube à des vitesses inégales dépendant de leur masse, de leur encombrement, c'est-à-dire de la résistance que les frottements opposent à leur mouvement, et de la densité du milieu dans lequel elles se trouvent *.

Dans un milieu de densité moyenne, à une faible vitesse de centrifugation, les particules les plus lourdes vont se déplacer relativement rapidement et s'accumuler au fond du tube pour former *un culot* qu'il est possible de récolter; les particules sensiblement plus légères pourront être collectées en soumettant le milieu restant, *le surnageant*, à une force centrifuge plus importante en augmentant la vitesse de rotation. On peut ainsi, par une succession de centrifugations réalisées à des vitesses progressivement croissantes et arrêtées à un moment judicieusement choisi, recueillir des particules de taille de plus en plus réduite *(fig. III-38, A)*, c'est la **centrifugation différentielle** (voir un exemple p. 227). Cette méthode ne permet pas toutefois d'obtenir des culots absolument

* Chaque particule ou molécule est caractérisée par le rapport de sa vitesse de sédimentation à l'accélération centrifuge, c'est-à-dire par son coefficient (ou constante) de sédimentation exprimé en unité Svedberg (S) du nom du savant suédois qui l'a proposée; comme nous le verrons les coefficients de sédimentation varient selon les espèces moléculaires et sont souvent utilisés pour les caractériser: ARN 5S, ARN 5,8S, ARN 45S...

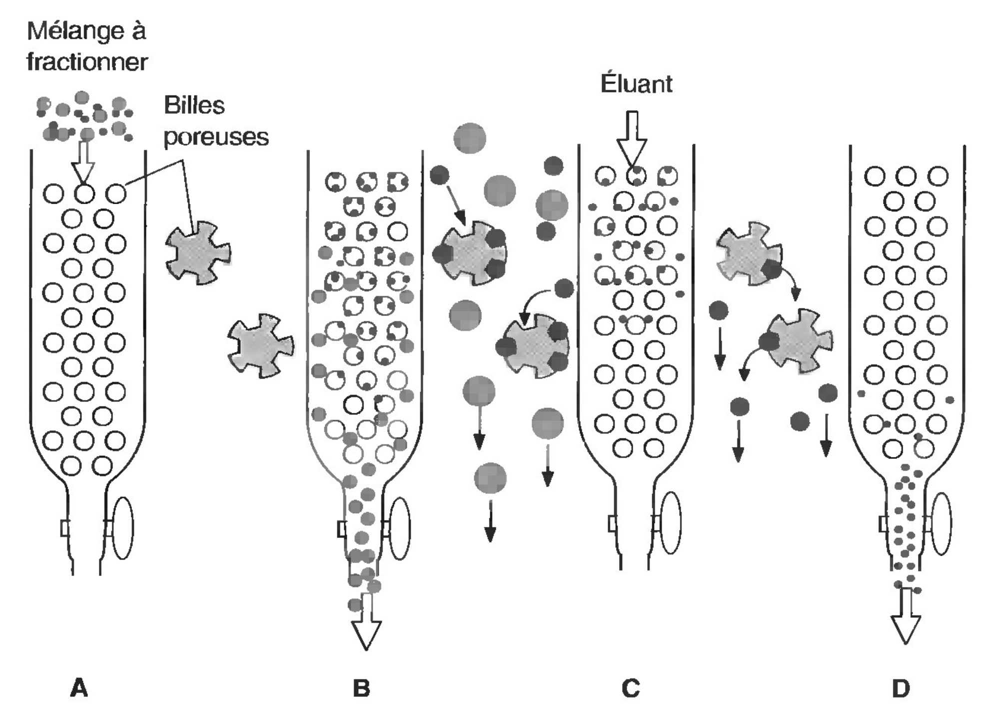


Fig. III-36 : Chromatographie d'exclusion (ou gel filtration).

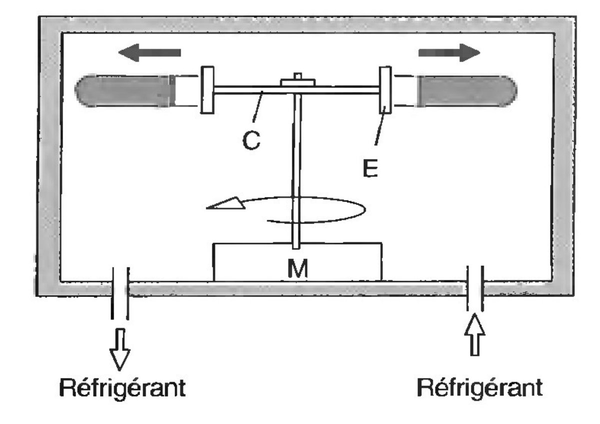


Fig. III-37 : Ultracentrifugation.
Les tubes contenant les molécules à isoler sont disposés dans des étriers (E) fixés sur une couronne (C) solidaire de l'axe d'un moteur (M) tournant à grande vitesse. Sous l'action de la force centrifuge, les particules se déplacent vers le fond du tube. Pour limiter l'élévation de la température due aux frottements, qui risque de provoquer la rupture des liaisons faibles et donc d'altérer la conformation des protéines, l'ensemble est placé dans une enceinte réfrigérée, sous vide.

purs ; des molécules ou particules plus légères, qui étaient au départ situées près du fond du tube, sont en effet souvent associées au culot, constituant le contaminant.

En outre, lorsque les particules sont de très petite taille, de masse et de forme très voisines, la centrifugation différentielle ne permet pas de les séparer ; on augmente alors la densité du milieu, ce qui permet d'accroître la différence entre les vitesses de sédimentation. C'est la centrifugation en gradient qui autorise la séparation en une seule étape ; elle peut être réalisée de manières différentes.

En gradient de densité préformé où un gradient de concentration, en saccharose par exemple, est mis en place dans le tube avant la centrifugation (*fig. III-38, B*) ; la densité est élevée au fond du tube (1,12 par exemple correspondant à une teneur de 30 % en saccharose) et plus faible au sommet (1,03 pour 10 % de saccharose) ; entre les deux, la variation peut être continue ou discontinue. Les molécules à séparer sont placées au sommet du tube ; lorsqu'elles sont soumises à centrifugation, elles se déplacent à des vitesses différentes ce qui conduit à les répartir, après quelque temps, en bandes plus ou moins bien séparées ; dans chacune de celles-ci les particules (ou les molécules) ont le même coefficient de sédimentation ; *les composés sédimentent en fonction de leur masse, de leur densité et de leur encombrement.* La centrifugation doit être arrêtée avant que les bandes se rejoignent au fond du tube. On récupère ensuite successivement les différentes strates moléculaires en perçant le fond du tube et en recueillant le milieu qui s'écoule.

En **gradient de densité à l'équilibre** où les particules à séparer sont mises en suspension dans un milieu

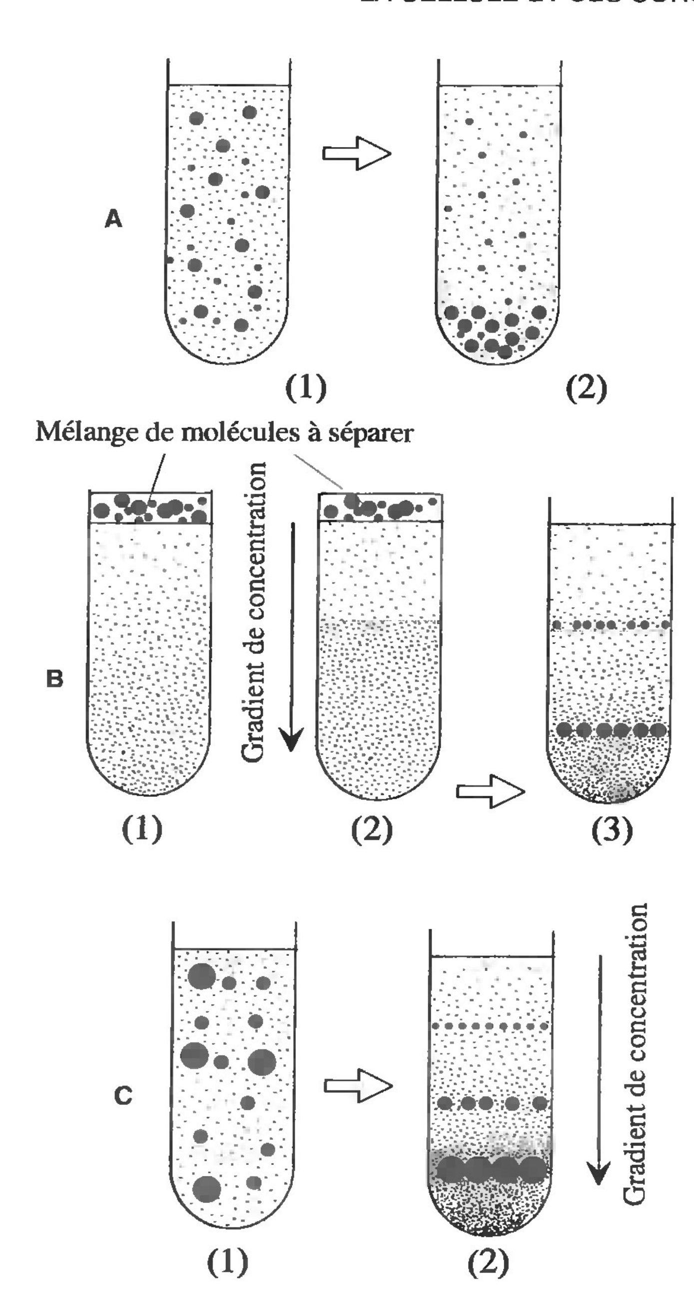


Fig. III-38 : Différents modes de centrifugations.
A) Centrifugation différentielle. Les molécules de masses moléculaires différentes sont en suspension dans le milieu soumis à la centrifugation (1). Après quelques minutes, les molécules les plus lourdes forment un culot au fond du tube (2).
B) Centrifugation en gradient de densité préformé ; le gradient peut être continu (1) ou discontinu (2). Le mélange à séparer est placé au sommet du tube. Au cours de la centrifugation les molécules se répartissent, en fonction de leur vitesse de déplacement, en bandes plus ou moins nettement séparées (3).
C) Centrifugation en gradient de densité à l'équilibre. Les molécules à séparer sont placées dans un milieu dont la densité est voisine de la leur (1). Après plusieurs heures de centrifugation les molécules sont situées dans le tube à un niveau où la densité du milieu est identique à la leur (2).

dont *la densité est voisine de la leur (fig. III-38, C)*. Après une centrifugation prolongée (10 à 40 heures), un équilibre s'établit dans lequel, *pour chaque molécule* (celles du milieu et celles à séparer), la tendance à sédimenter est exactement compensée par la tendance à diffuser dans la direction opposée ; entre le haut et le fond du tube il s'établit un gradient continu ; dans celui-ci, au cours de la centrifugation, les molécules ou particules à séparer se disposent en bandes à un niveau dont la densité correspond à leur propre densité. Ce niveau atteint, le déplacement cesse : *il y a équilibre* ; la centrifugation doit donc être prolongée jusqu'au moment où celui-ci est réalisé. Cette méthode extrêmement précise, *où le déplacement est fonction de la seule densité de la molécule*, a été mise au point pour démontrer le mode semi-conservatif de la réplication des molécules d'ADN (voir p. 363).

C. Méthode fondée sur l'ionisation des molécules protéiques

La séparation avec les ***colonnes échangeuses d'ions*** est une méthode déjà utilisée pour isoler les acides aminés (voir p. 36). La solution contenant les protéines est versée au sommet d'une colonne remplie de billes chargées constituant *la phase stationnaire (fig. III-39, A)*. Elles peuvent être chargées positivement, par des groupements basiques, ce sont des échangeuses d'anions et les molécules protéiques s'y accrocheront alors d'autant plus rapidement que leur charge négative est importante* ; celles globalement positives, ou neutres, traverseront et seront récupérées en premier à la base de la colonne *(fig. III-39, B)*. Pour récupérer les protéines liées aux billes, on va jouer sur le pH et/ou sur la force ionique du milieu ; on peut par exemple verser une solution à pH acide ; les protéines initialement chargées négativement (donc lorsque le pH est supérieur au pHi) vont devenir positives puisqu'elles sont alors situées dans un environnement dont le pH est inférieur au pHi et perdre leur affinité pour l'échangeur d'ions, *c'est l'élution (fig. III-39, C)*. Des colonnes contenant des billes chargées négativement (porteuses de groupements acides), échangeuses de cations, existent également**.

---

* La charge globale d'une protéine dépend du pH du milieu : une protéine est chargée négativement lorsqu'elle est à un pH supérieur à son pHi et chargée positivement à un pH inférieur à son pHi : au pHi, elle est neutre.

** Des colonnes de chromatographie, qui contiennent des résines sous forme de billes minuscules, très comprimées, ont été mises au point. Le flux de solvant est plus régulier et le pouvoir de résolution très élevé, c'est la chromatographie HPLC *(high-performance liquid chromatography)* ; l'inconvénient est que l'écoulement est très lent s'il n'est pas réalisé sous pression ; celle-ci est obtenue à l'aide de pompes et les colonnes, qui doivent être très résistantes, sont en acier.

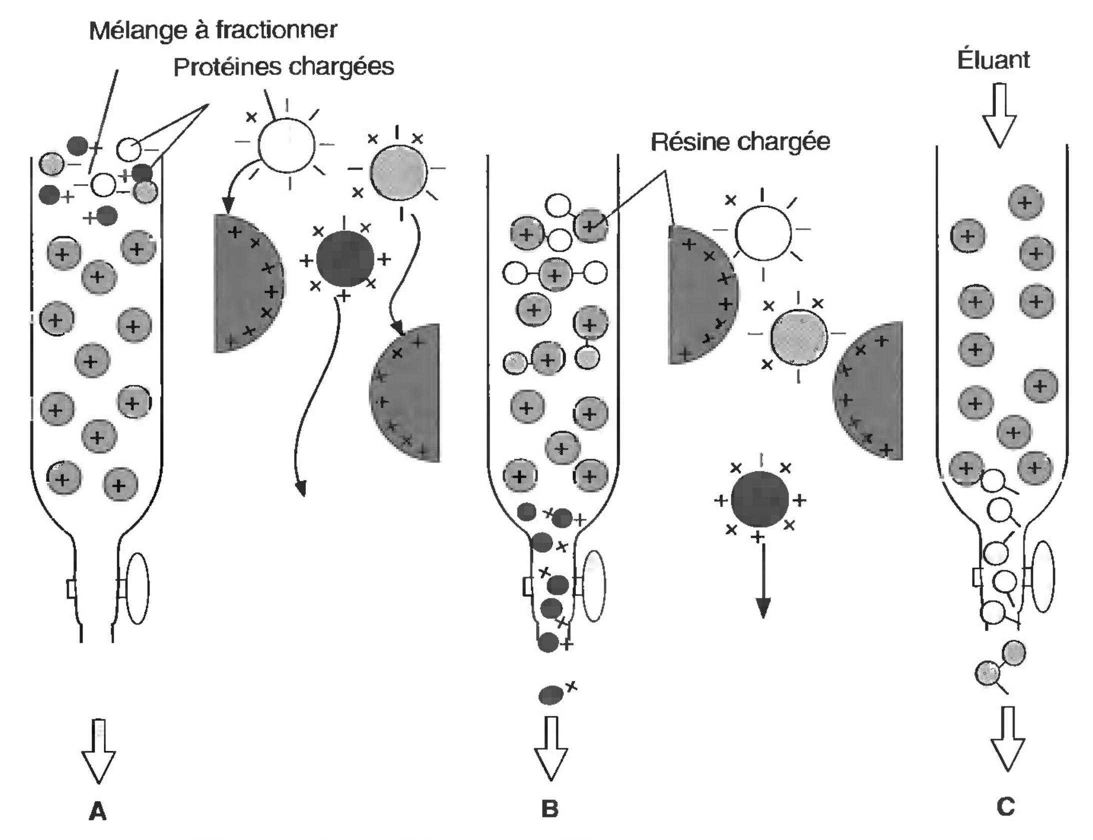


Fig. III-39 : Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions.

L'**électrophorèse** est fondée sur le déplacement des molécules chargées dans un champ électrique et nous avons vu qu'elle permet, à l'aide d'un support poreux (papier, acétate de cellulose...), de séparer les acides aminés ionisés (voir p. 39).

La vitesse du déplacement dépend de l'intensité du champ électrique, de la charge nette* de la molécule et des frottements engendrés par leur encombrement, ce qui permet de l'associer à une filtration en utilisant comme support un gel. Les gels sont en effet *de véritables tamis* que les molécules de petite taille traversent aisément alors que les plus volumineuses y circulent difficilement.

On utilise le plus souvent des gels de polyacrylamide, substance chimiquement inerte, facilement fabriquée par polymérisation et où il est possible, en modifiant la composition du mélange initial, de contrôler le diamètre des pores.

L'**électrophorèse unidimensionnelle** est réalisée dans des gels coulés dans des tubes ou entre deux plaques de verre *(fig. III-40)*; les protéines sont dissoutes et souvent dénaturées par un agent chimique comme l'urée (qui rompt les liaisons faibles) et le β-mercaptoéthanol, ou le dithiothréitol, qui coupe les ponts disulfure ; elles sont alors placées au sommet du gel et se déplacent dans le champ électrique, du pôle – vers le pôle + si leur charge est négative, du + vers le – si elles sont positives. La séparation des protéines est alors fonction de leur charge nette d'une part, de leur taille, c'est-à-dire de la facilité avec laquelle elles circulent entre les mailles du gel, d'autre part. Beaucoup de protéines sont toutefois faiblement chargées, on utilise alors comme dénaturant, à la place de l'urée, du SDS (sodium dodécyl sulfate) qui se fixe sur les résidus d'acides aminés en introduisant uniformément un très grand nombre de charges négatives ; la vitesse de migration de toutes les protéines est identique puisqu'elles ont toutes la même charge nette, toutes les molécules ayant fixé du SDS dans le même rapport stœchiométrique que l'on estime à un SDS pour deux résidus d'acides aminés. La séparation des protéines sera donc seulement fonction de leur taille et d'autant plus rapide que la molécule est petite ; c'est l'effet de tamis du gel.

Des colorations permettent ensuite de visualiser les protéines dans le gel *(fig. III-41)*.

L'**électrophorèse par iso-électrofocalisation** est fondée sur la charge globale propre d'une protéine qui dépend de la proportion relative des acides aminés acides et basiques la constituant. Cette charge varie suivant le pH ; pour une certaine valeur de celui-ci, elle est nulle et la molécule placée dans un champ électrique ne se déplace plus. La technique consiste à créer dans le gel, sur plaque ou dans un tube, un gra-

* Charge nette de la molécule = charge globale / masse.

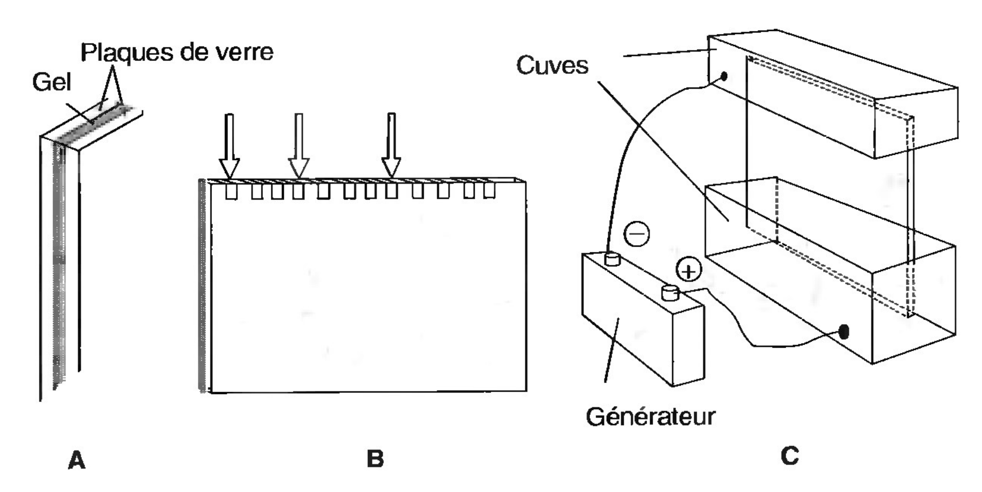


Fig. III-40 : Électrophorèse sur plaque.
A) Position du gel entre deux plaques de verre.
B) Puits creusés dans la partie supérieure du gel (flèches) dans lesquels sont déposées les protéines à séparer (chargées négativement après dénaturation par le SDS).
C) Position du gel fermant le circuit électrique entre deux cuves contenant un milieu tamponné.

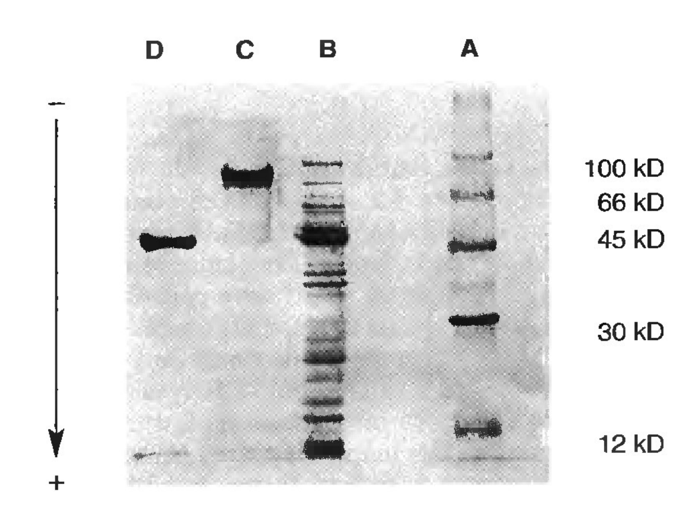


Fig. III-41 : Gel d'électrophorèse après révélation par un colorant des protéines, le bleu de coomassie.
À la fin de l'électrophorèse, les protéines sont réparties en bandes dont la position dépend de la vitesse à laquelle elles se sont déplacées dans le champ électrique.
L'expérience ayant nécessité cette électrophorèse avait pur but de suivre les étapes de purification d'une protéine P.
A) Des protéines de masse moléculaire connue ont été soumises à la même électrophorèse ; servant de référence, elles permettent d'estimer la masse moléculaire des protéines isolées.
B) Extrait brut des protéines solubles obtenues à partir d'une bactérie.
C) Protéine purifiée par précipitation fractionnée et passage sur colonne échangeuse d'ions ; l'électrophorèse est effectuée en conditions *non dénaturantes.*
D) Protéine purifiée de la même manière qu'en C mais après une électrophorèse réalisée en conditions dénaturantes (rupture des ponts disulfure). La mobilité électrophorétique de la protéine est augmentée, ce qui signifie qu'elle est constituée de sous-unités (structure quaternaire) identiques puisqu'une seule bande apparaît.

dient stable de pH ; les protéines qui y sont placées et soumises à un champ électrique migreront jusqu'au point où le pH leur confère une charge globale nulle ; c'est le pHi : il y a focalisation isoélectrique.

L'électrophorèse bidimensionnelle est obtenue par la combinaison des deux méthodes précédentes. Dans un premier temps, les protéines sont séparées par isoélectrofocalisation en tube, puis le gel contenu dans celui-ci est placé au sommet d'un autre gel en plaque, dans un milieu contenant du SDS ; la nouvelle électrophorèse est donc réalisée à 90° de la précédente. Les protéines forment alors des taches espacées sur toute la surface du gel et leur position dépend de leur pHi (première électrophorèse) et de leur encombrement (seconde électrophorèse). La définition est donc extrêmement précise.

D. *Méthode fondée sur les interactions spécifiques : la chromatographie d'affinité*

Les protéines possèdent une organisation spatiale (structure tertiaire) qui leur confère des propriétés spécifiques. Les enzymes, les anticorps, les récepteurs membranaires peuvent reconnaître d'autres molécules, protéiques ou non, de manière extrêmement spécifique (voir pages suivantes). Ces interactions sont utilisées pour séparer des molécules d'un mélange. La solution où se trouve la molécule à isoler, protéique par exemple, est versée au sommet d'une colonne contenant des billes porteuses d'un groupement chimique spécifique (par exemple de l'insuline pour isoler les récepteurs membranaires de cette hormone, le substrat si c'est une enzyme que l'on veut isoler), c'est *le ligand (fig. III-42)*. Seules les molécules susceptibles d'interagir avec le ligand seront retenues, les autres traverseront la colonne. Les complexes (ligand-récepteur, anticorps-antigène, enzyme-substrat...) sont ensuite dissous et une élution permet la récupération des molécules.

On dispose donc de méthodes très variées pour isoler les protéines ; elles n'ont toutefois pas la même valeur et doivent être utilisées avec discernement. Pour obtenir de grandes quantités de protéines sous une forme active, sans chercher une purification parfaite, on utilisera des méthodes comme la dialyse, le gel-filtration ou les colonnes échangeuses d'ions. Pour identifier les différents constituants d'un mélange on fera appel à la centrifugation sur gradient ou à l'électrophorèse, la première permettant d'obtenir de plus grandes quantités de molécules que la seconde, qui reste toutefois beaucoup plus précise puisqu'elle permet de distinguer un très grand nombre de protéines à partir d'un volume très réduit. Enfin, pour isoler sans dénaturation une espèce moléculaire particulière, on emploiera la chromatographie d'affinité qui demeure la seule à être véritablement spécifique, mais qui pose de gros problèmes de dissociation de complexes sans altération des protéines ainsi isolées.

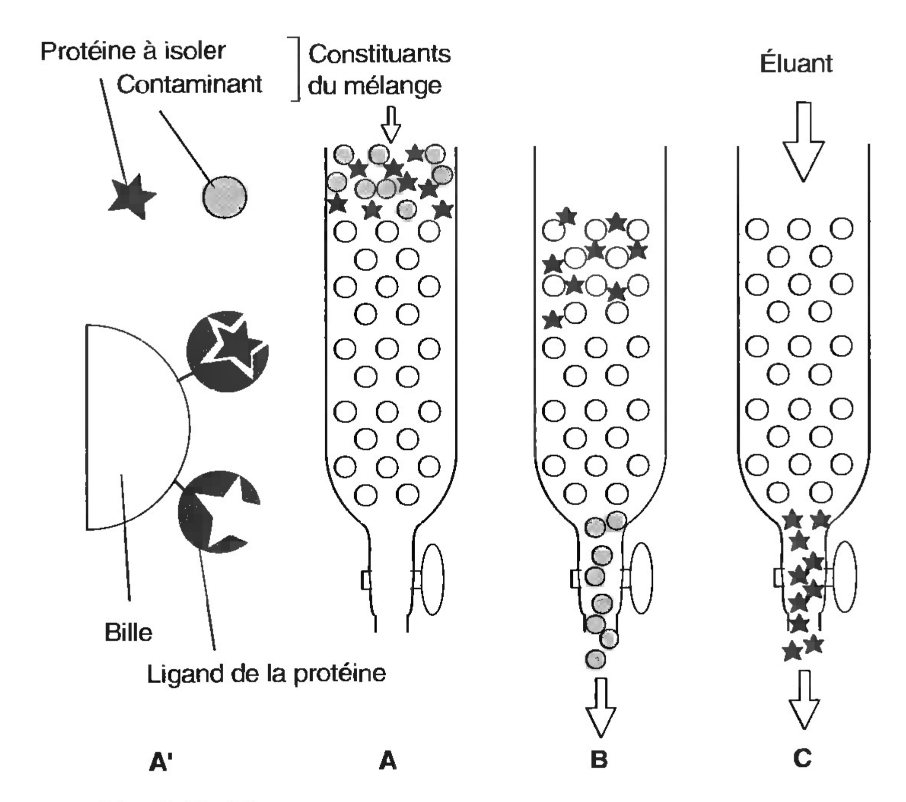


Fig. III-42 : Chromatographie d'affinité.

A) La protéine à isoler et les contaminants sont versés au sommet d'une colonne contenant des billes (A') auxquelles on a associé un ligand spécifique.

B) Les contaminants traversent librement la colonne tandis que les protéines interagissant avec le ligand sont retenues.

C) Un éluant dissociant le complexe protéine-ligand permet de récupérer la protéine.

2. QUELQUES EXEMPLES DE PROTÉINES

Les protéines sont classiquement rangées en 2 grandes familles, sur la base de critères morphologiques et physiques, mais qui vont de pair avec des réalités fonctionnelles. Ce sont :

– les **protéines fibreuses**, c'est-à-dire des protéines de forme allongée ou oblongue, *riches en régions à configurations secondaires*, souvent insolubles dans l'eau et ayant généralement un rôle structural et protecteur. Ce sont les protéines qui forment chez les Mammifères la matrice de la peau, des os et des ligaments. Ce sont aussi les protéines entrant dans la composition de la soie du ver à soie ; elles sont également une composante importante du cytosquelette des cellules eucaryotes ;

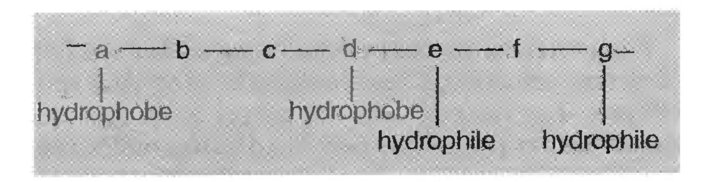
– les **protéines globulaires**, c'est-à-dire des protéines de forme plus ou moins sphérique, souvent relativement solubles dans l'eau, et ayant des rôles aussi variés que la catalyse, le transport, la défense et le contrôle génétique.

Quelques exemples seront décrits en détail dans ce chapitre. D'autres seront traités ultérieurement dans les chapitres consacrés à certains compartiments ou organites cellulaires (membrane plasmique, cytosquelette...).

2.1 L'α-KÉRATINE, LE COLLAGÈNE ET LA FIBROÏNE, PROTÉINES FIBREUSES À RÔLE STRUCTURAL

Les **kératines** (du grec *keras*, corne) sont les protéines des cheveux, des ongles et de la peau. Parmi les kératines, l'α-kératine est la protéine constituant presque exclusivement les cheveux et la laine.

La structure primaire de la protéine est faite de segments répétitifs de 7 acides aminés. Dans chaque segment, les 1er et 4e acides aminés sont hydrophobes, tandis que les 5e et 7e sont hydrophiles, comme l'indique la séquence suivante :



Les polypeptides sont organisés en hélice α. Les segments de 7 acides aminés constituant environ 2 tours d'hélice (on rencontre en effet 3,6 résidus par tour), les résidus hydrophobes vont être alignés et former une arête apolaire sur un côté de l'hélice α se mettant en regard de l'arête apolaire d'une autre hélice α *(fig. III-43)*. Il se forme ainsi une superhélice qui contient 2 ou 3 hélices α : c'est la *protofibrille*.

Les protofibrilles sont elles-mêmes assemblées en super-édifices appelés *microfibrilles*, câbles de 7 nm de diamètre environ et contenant de 9 à 11 protofibrilles. Le niveau hiérarchique supérieur correspond aux *macrofibrilles* qui occupent les kératocytes, c'est-à-dire les cellules du cheveu ou les cellules du cortex d'une fibre de laine *(fig. III-44)*. La kératine est très *résistante à la traction* qui s'exerce sur les liaisons covalentes de la chaîne. Elle est très *extensible et élastique* (on peut dans certaines conditions doubler sa longueur par étirement), cela en raison de l'entrelacement des hélices et de la souplesse des liaisons faibles entre les microfibrilles.

L'α-kératine contient une forte concentration de cystéine, ce qui entraîne la formation de nombreux ponts disulfure, soit entre les chaînes polypeptidiques elles-mêmes (ponts

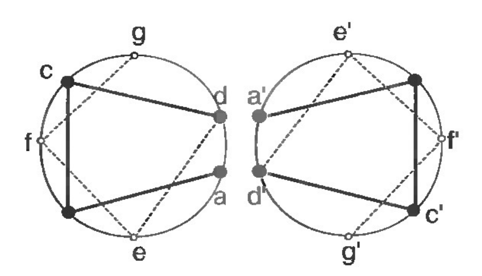


Fig. III-43 : Interaction des arêtes apolaires de deux chaînes polypeptidiques voisines d'α-kératine à configuration en hélice α.

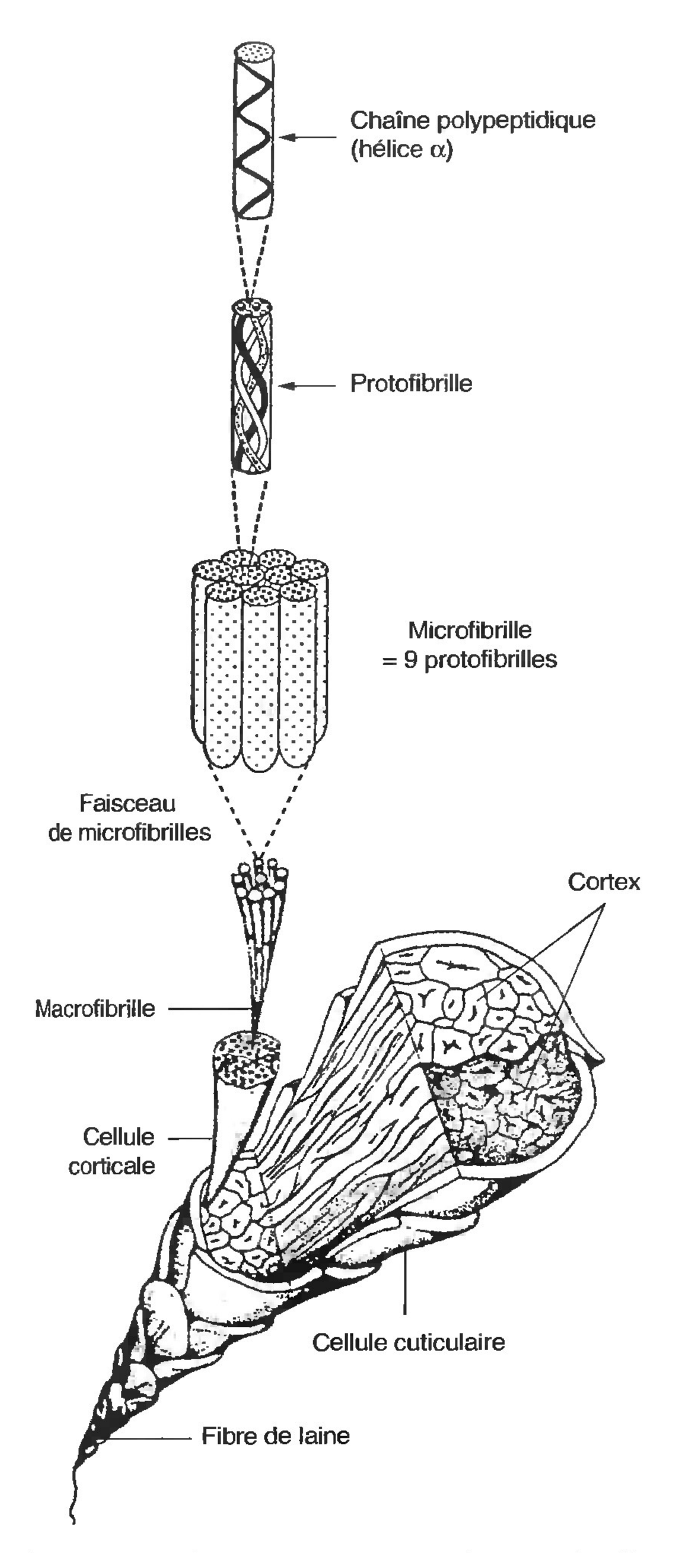


Fig. III-44 : Hiérarchie dans l'organisation de l'α-kératine.

De la molécule d'a-kératine à la fibre de laine. La région centrale de la fibre, le cortex, est un arrangement de cellules en forme de fuseau occupées par les macrofibrilles. L'ensemble est recouvert de cellules aplaties formant la cuticule.

(Reproduit d'après la figure 1 de L.M. DOWLING et L.G. SPARROW. Sequences of wool keratin proteins. The Csiro connections, TIBS 1991 ; 16 : 115-116.)

intercaténaires), soit avec une protéine matricielle amorphe, la kératohyaline. Il devient facile d'expliquer ce qui se passe lors d'une mise en plis ou mieux d'une « permanente » en art capillaire. Dans un premier temps on applique un produit réducteur (par exemple l'acide thioglycolique pendant deux heures) pour rompre les liaisons disulfure. Les cheveux sont ensuite remodelés dans une atmosphère humide et éventuellement chaude (à ce stade des liaisons H intercaténaires sont rompues). Enfin on applique un oxydant (par exemple l'eau oxygénée). Des liaisons disulfure se reforment, mais elles sont différentes des liaisons natives. Selon la nature des cheveux, la configuration native (thermodynamiquement la plus stable) reprend plus ou moins vite le dessus : la permanente « tient » plus ou moins longtemps.

D'un tissu à l'autre les séquences primaires des kératines varient, en particulier le nombre des résidus cystéine et en conséquence le nombre de pontages possibles. Ainsi leur augmentation conduit à la formation de tissus durs et coriaces tels les ongles, les sabots des animaux, la carapace des tortues.

Le **collagène** est un autre exemple de protéine fibrillaire dans lequel plusieurs niveaux hiérarchisés d'assemblage sont reconnaissables *(fig. III-45)*. Le collagène (étymologiquement *qui donne la colle* : c'est la protéine extraite des os et qui forme la gélatine ou colle d'os) est une protéine très répandue et très conservée constituant la matrice extracellulaire des cellules animales.

La séquence primaire du collagène est exceptionnellement monotone. Elle est faite d'une succession de motifs tripeptidiques :

–(Gly–X–Y)–(Gly–X–Y)–(Gly–X–Y)–

À cause de la présence de glycine (acide aminé ayant le plus faible encombrement) tous les 4 résidus, et de l'abondance en hydroxyproline, c'est-à-dire en proline porteuse de fonction –OH (la proline entraîne l'impossibilité de conformation en hélice α), les polypeptides sont organisés en hélices droites d'un type particulier (avec 3 acides aminés par tour). Trois hélices entrelacées forment ensuite la superhélice du *tropocollagène*. Des

assemblages d'ordre supérieur conduisent à la fibre de collagène d'aspect strié au microscope électronique *(fig. III-45)*.

Comme l'α-kératine, le collagène est une protéine *extrêmement résistante à l'extension.* Ainsi le collagène entre dans la composition du « boyau » de cordage des raquettes de tennis, ou du « catgut » utilisé en chirurgie. L'organisation de l'α-kératine et du collagène (fibrilles et matrices) a conduit à comparer ces systèmes à un véritable béton armé.

La **fibroïne**, protéine sécrétée par le ver à soie, représente le modèle classique de protéine fibreuse en feuillets plissés β. Sa structure primaire comporte un motif répétitif riche en glycine et alanine.

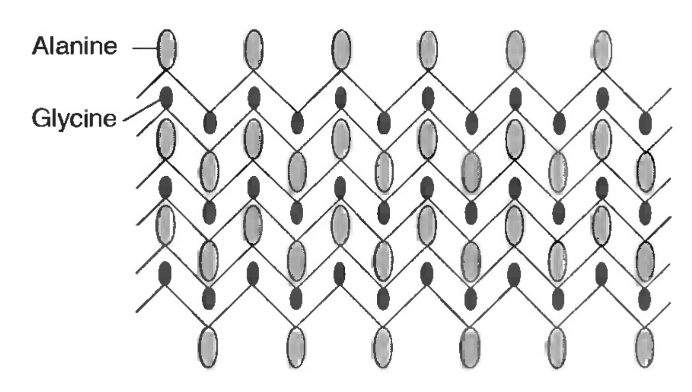


Fig. III-46 : Organisation de la fibroïne.
Plan perpendiculaire à celui des feuillets β associés par des liaisons hydrogène.

Les feuillets sont antiparallèles et forment des nappes qui s'entassent glycine contre alanine et alanine contre glycine *(fig. III-46)*. La soie est *flexible* car les liaisons hydrogène entre les feuillets et les forces de Van der Waals maintenant les nappes sont facilement rompues. Comme la kératine et le collagène, la molécule est *résistante*, la force de résistance étant due aux liaisons covalentes. En revanche la fibroïne a une *extensibilité limitée.* On ne peut l'étirer car les feuillets β sont déjà étendus.

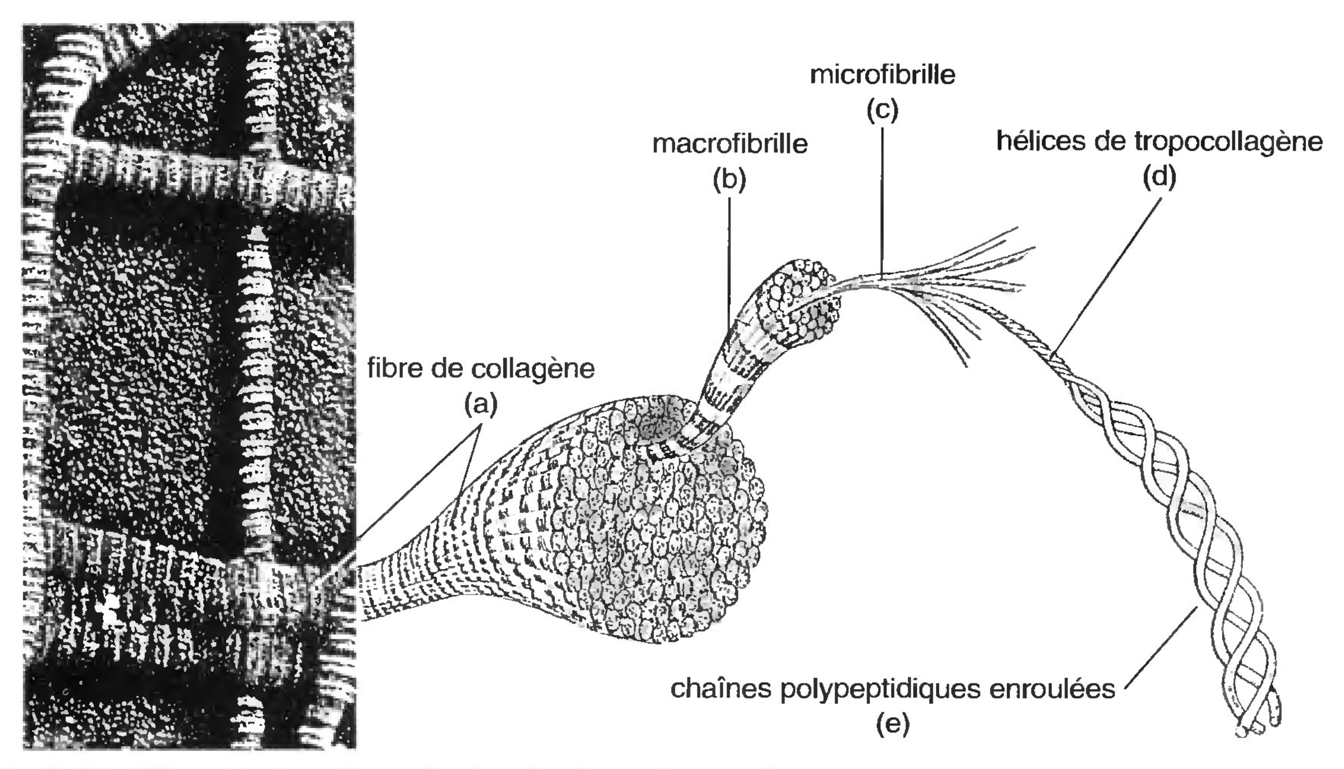


Fig. III-45 : Hiérarchie dans l'organisation des fibres de collagène.
Les fibres de collagène telles qu'elles apparaissent au microscope électronique (a) sont composées de macrofibrilles (b), elles-mêmes constituées par l'association de microfibrilles (c). Chaque microfibrille est formée par des faisceaux d'hélices de tropocollagène (d) dans chacune desquelles 3 chaînes polypeptidiques forment une hélice droite (e).
(Reproduit à partir de la figure 10-16 de W.M. BECKER. The world of the cell. Menlo Park: The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc., 1986.)

2.2. LES ENZYMES, PROTÉINES GLOBULAIRES À ACTIVITÉ CATALYTIQUE

La cellule est une sorte de laboratoire où se passent à la fois des phénomènes de synthèse *(anabolisme)* et des phénomènes de dégradation *(catabolisme)*. Tous ces phénomènes sont effectués au prix d'énergie, l'anabolisme consommant de l'énergie (réaction endergonique), le catabolisme libérant de l'énergie (réaction exergonique). Dans le monde vivant les réactions doivent se passer dans des conditions douces par rapport aux conditions de la chimie organique, c'est-à-dire à la température de l'organisme qui correspond à une isothermie tempérée, dans une étroite frange de pH et en milieu de force ionique généralement faible.

Ces réactions ne peuvent se produire qu'en présence de catalyseurs, les **enzymes** (du grec *en zumê*, dans la levure, d'après KÜHNE observant en 1878 qu'un simple jus de levure est capable de transformer le sucre en alcool).

A. Catalyse chimique et catalyse biologique

Avant d'entrer dans le détail du fonctionnement des enzymes, il est nécessaire de définir les différences entre une catalyse chimique et une catalyse enzymatique. La dégradation de l'urée sera prise comme exemple *(fig. III-47)*.

On s'aperçoit que, à 20 °C, c'est-à-dire aux températures voisines des températures biologiques, si l'on dissout de l'urée dans l'eau, la réaction d'hydrolyse ne se produit pas. Si la température augmente (par exemple si l'on chauffe à 100 °C), on peut en revanche déclencher l'hydrolyse. La réaction chimique qui ne pouvait se faire spontanément est devenue possible car on a fourni au système une *énergie d'activation*, permettant au composé de se mettre dans un état de transition, ou état activé, où les molécules sont riches en énergie. À partir de cet état, la réaction se produit; elle restitue l'énergie empruntée puis libère l'énergie de réaction *(fig. III-48)*.

Si l'on ajoute un acide, par exemple de l'acide chlorhydrique HCl, la réaction d'hydrolyse peut se produire à une température plus basse. Le niveau d'énergie d'activation a été abaissé. C'est une ***catalyse chimique***.

Si l'on ajoute de l'uréase, c'est-à-dire une enzyme spécifique de la dégradation de l'urée, la réaction d'hydrolyse se produit à une température encore plus basse, compatible avec les conditions biologiques. L'enzyme a considérablement abaissé la barrière de l'énergie d'activation et augmenté la vitesse de réaction. C'est la ***catalyse biologique*** qui rend possible la transformation des composés carbonés dans des conditions cellulaires *(fig. III-48)*. Sans les enzymes les réactions se feraient trop lentement tant est grande la stabilité des molécules organiques. Ainsi la même quantité de liaisons peptidiques d'un morceau de viande peut être dégradée en 2 heures à 37 °C en présence d'une protéase, la pepsine, ou en 2000 heures avec de l'acide chlorhydrique à 3 % à la même température.

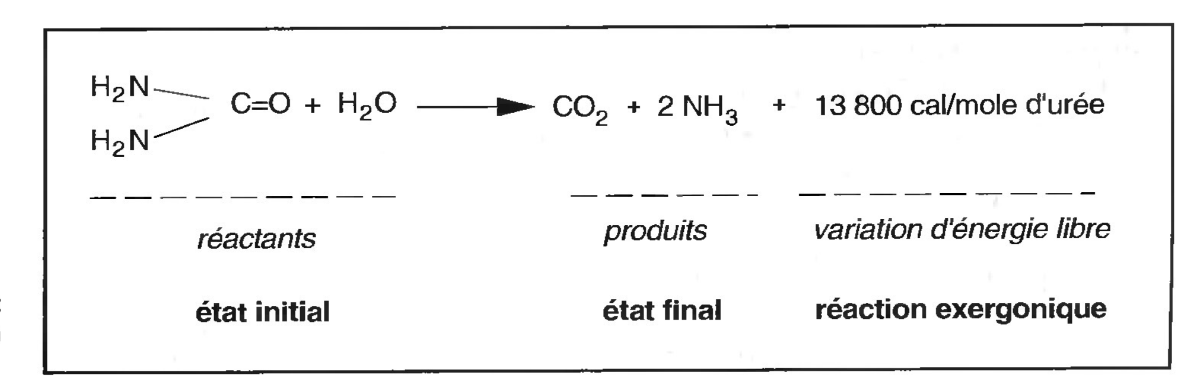


Fig. III-47 : Dégradation de l'urée.

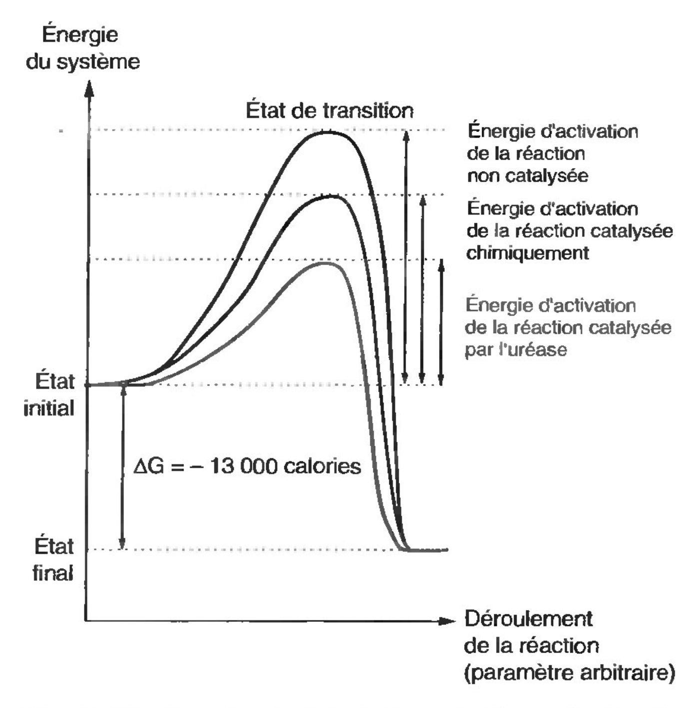


Fig. III-48 : Courbe de l'évolution de l'énergie d'activation dans la dégradation de l'urée.
L'énergie d'activation de la réaction est légèrement abaissée dans la catalyse chimique. L'uréase impliquée dans la catalyse enzymatique abaisse encore plus fortement la barrière de l'énergie d'activation et accélère la réaction (courbe rouge).

B. Classification des enzymes

L'idée que les enzymes sont des protéines est relativement récente. Longtemps on a pensé que les protéines étaient des impuretés qui accompagnaient les enzymes. En ce qui concerne l'uréase, précédemment citée, ce n'est qu'en 1926 que la molécule a pu être cristallisée par SUNMER montrant ainsi sa structure protéique. On connaît actuellement plusieurs dizaines de milliers d'enzymes dont environ 2000 ont été purifiées.

On distingue des enzymes entièrement protéiques, ce sont les *holoenzymes* et des *hétéroenzymes* comprenant deux parties :

– la partie protéique appelée *apoenzyme*. Elle est quelquefois phosphorylée ou glycosylée. Il sera vu ultérieurement qu'elle intervient dans la fixation du substrat, donc dans la spécificité de l'enzyme ;

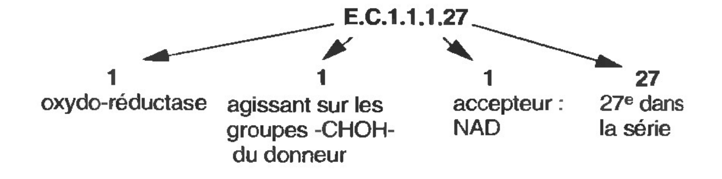
– une partie non protéique, appelée *coenzyme* (ou *groupement prosthétique)*, de faible masse moléculaire, obligatoirement liée à l'enzyme. Ce peut être un métal (calcium, magnésium, sodium, potassium, cuivre), une vitamine ou un noyau complexe.

Longtemps la terminologie désignant les enzymes est restée désordonnée. Certains noms désignant l'origine de l'enzyme ont toutefois été conservés (papaïne, pepsine...). Souvent la terminaison *ase* a simplement été ajoutée au nom du substrat de l'enzyme (amyl*ase*, peptid*ase*, uré*ase*...). Depuis 1961 la Commission des Enzymes (EC) de l'Union Internationale de Biochimie a proposé une nouvelle nomenclature officielle. Elle range les enzymes en 6 classes principales :

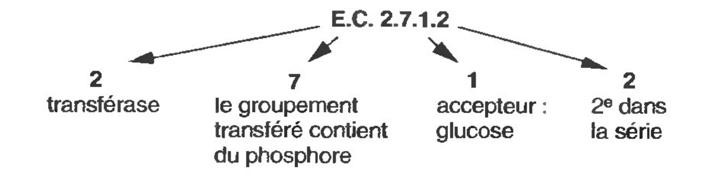
1) *Oxydo-réductases* : transfert d'électrons ou d'électrons associés à des protons ;
2) *Transférases* : transfert d'un groupe fonctionnel sur un accepteur ;
3) *Hydrolases* : l'accepteur est l'eau. Le substrat est scindé ;
4) *Lyases* : rupture d'une liaison et création d'une double liaison sur le substrat ;
5) *Isomérases* : isomérisation, épimérisation ;
6) *Ligases ou synthétases* : liaison de molécules aux dépens de l'ATP.

Chaque enzyme est désignée par 4 chiffres qui indiquent respectivement : la place de l'enzyme dans l'une ou l'autre de ces 6 classes ; la sous-classe, c'est-à-dire le type de fonction du substrat engagé dans la réaction ; la nature de l'accepteur ; le numéro de l'enzyme dans la série.

Par exemple la NAD-oxydo-réductase est :



La glucokinase ou ATP : D–glucose 6-phosphotransférase est :



C. Cinétique enzymatique

Soit la réaction de dégradation de l'urée :

$$\begin{matrix} H_2N \\ H_2N \end{matrix} \!\!> C = O + H_2O \xrightarrow[\text{enzyme}]{\text{uréase}} CO_2 + 2\,NH_3$$

substrat — *produits*

On peut évaluer la vitesse de la réaction en mesurant la quantité de produit formé, ou de substrat dégradé, en fonction du temps *(fig. III-49)*. On définit la *vitesse initiale* de la réaction comme la pente de la tangente à l'origine, c'est-à-dire la vitesse du système tant que le substrat est présent en excès *(fig. III-49, A)*. Ensuite la courbe s'infléchit traduisant l'épuisement en substrat. Dans les conditions où la réaction se fait sur un large excès de substrat, la vitesse initiale de la réaction est proportionnelle à la concentration en enzyme comme le montre la *figure III-49, B*. La pente de la tangente varie en fonction de cette concentration.

En revanche si l'on fait varier *la concentration en substrat pour une concentration fixe d'enzyme*, on s'aperçoit que la vitesse initiale de réaction n'est pas proportionnelle à la concentration du substrat. Elle augmente d'abord de façon linéaire pour de faibles concentrations en substrat, puis la courbe tend vers une asymptote au niveau de laquelle l'augmentation de la concentration en substrat ne fait plus varier la vitesse initiale de réaction. Cette vitesse est appelée *Vitesse maximum* ou V_{max} *(fig. III-50)*. La vitesse maximum de la réaction dépend là encore de la concentration en enzyme.

Le concept de vitesse maximum a permis de comprendre que, dans la réaction, le facteur limitant est l'enzyme et de proposer l'hypothèse selon laquelle le substrat se combine de façon réversible à l'enzyme pour former un *complexe enzyme-substrat* transitoire et dissociable :

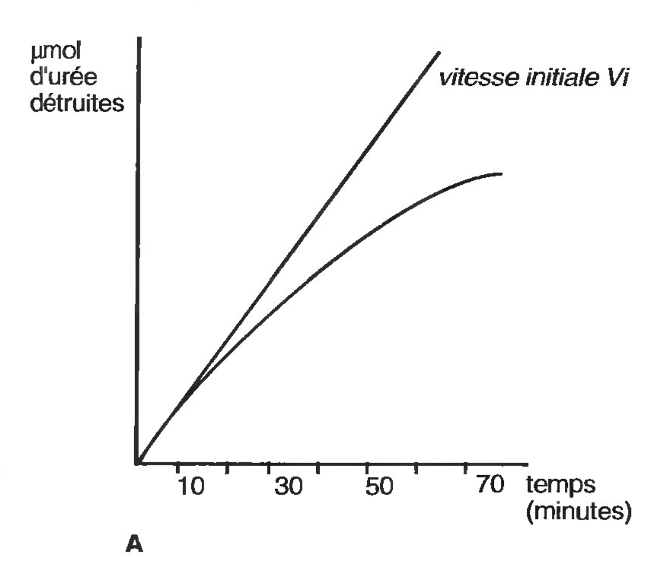
$$E + S \longrightarrow (ES) \longrightarrow E + P$$

La vitesse croît tant que toute l'enzyme disponible n'est pas sous la forme du complexe ES. Le complexe ES se dissocie dès que la réaction a eu lieu. La libération de P permet par ailleurs de régénérer l'enzyme libre qui peut recommencer un cycle avec une autre molécule de substrat.

On peut appliquer la loi d'action de masse à la formation du complexe enzyme-substrat :

$$\frac{(E) \times (S)}{(ES)} = K$$

K est assimilé à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. Il est difficile de connaître avec précision la valeur de la concentration en substrat pour laquelle l'enzyme est



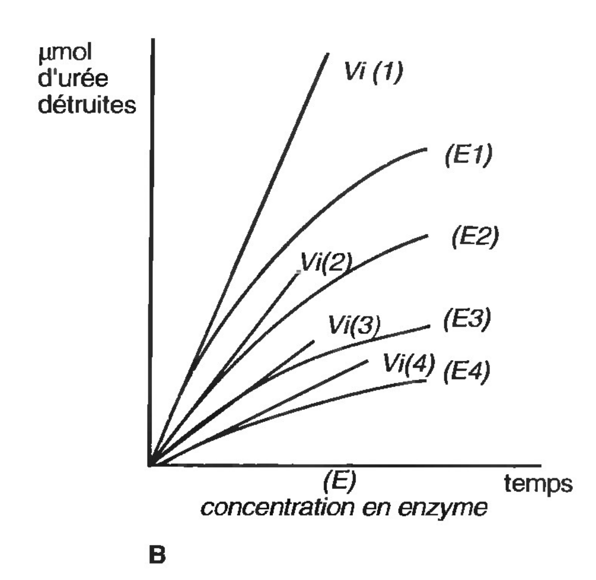


Fig. III-49 : Vitesse d'une réaction enzymatique.
A) La vitesse initiale est la pente de la tangente à l'origine.
B) Proportionnalité entre vitesse initiale Vi (1 à 4) et concentration en enzyme (E1 à E4).

totalement saturée puisque la vitesse maximale de la réaction est donnée pour une concentration « infinie » du substrat (asymptote sur la *figure III-50*). Cette difficulté a été levée en prenant comme référence la valeur approchée de la moitié de la vitesse maximum. C'est la concentration pour laquelle :

(E) = (ES),

la moitié de l'enzyme est libre et l'autre moitié complexée au substrat. L'équation de la loi d'action de masse s'écrit alors :

(S) = K,

S représentant une concentration en mol/l

K étant la caractéristique de la demi-vitesse maximum.

Cette constante est la *constante de dissociation de Michaelis-Merten, le K_m*. Par définition le K_m est donc la concentration en substrat (en moles/litre) pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximum (1/2 V_{max}). La connaissance des valeurs du K_m est très utile pour apprécier le pouvoir catalytique ou mieux le degré d'affinité d'une enzyme pour son substrat. ***Plus le K_m est grand***, plus il faut de substrat pour « saturer » l'enzyme : ***l'enzyme a peu d'affinité pour le substrat***. En revanche, ***si le K_m est petit***, il faut peu de substrat pour saturer l'enzyme : ***l'enzyme a une grande affinité pour le substrat***.

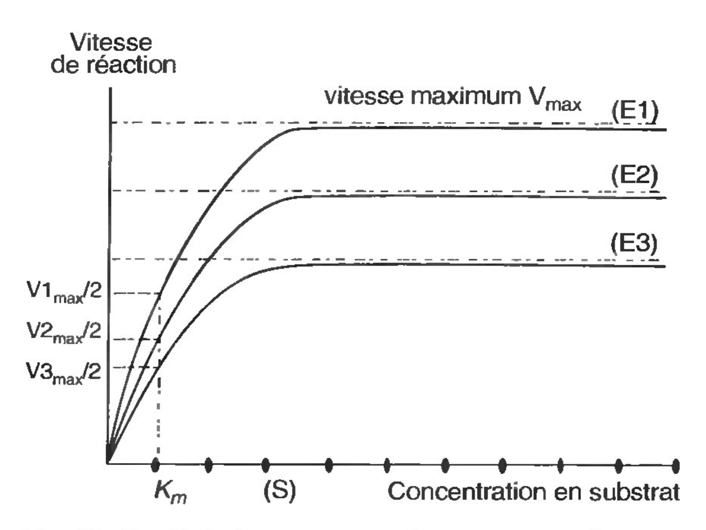


Fig. III-50 : Relation entre la vitesse d'une réaction enzymatique et la concentration en substrat.
La vitesse de réaction tend vers une limite (vitesse maximum) qu'elle ne peut dépasser même lorsque la concentration en substrat s'accroît. La vitesse maximum de réaction diminue avec la concentration en enzyme (E1 > E2 > E3).

La *figure III-51* donne quelques valeurs de K_m pour certaines enzymes. Ainsi on voit que la valeur du K_m de l'hexokinase est 10 fois plus élevée pour le fructose que pour le glucose. L'enzyme a donc une plus grande affinité pour le glucose que pour le fructose. On a donc ainsi une idée de l'efficacité de la catalyse enzymatique.

Enzyme	Substrat	K_m (mM)
Catalase	H_2O_2	25.0
Hexokinase	Glucose	0,15
	Fructose	1,5
Chymotrypsine	Glycyltyranosinamide	122,0
	N-benzoyltyranosinamide	2,5

Fig. III-51 : Valeurs du K_m de quelques enzymes.

D. Le site actif de l'enzyme

a. Les conditions dénaturantes pour la protéine changent l'activité de l'enzyme

L'influence de la *température* sur une réaction enzymatique est représentée sur la *figure III-52, A*. Une élévation de la température augmente la vitesse de réaction chimique ; elle est due à une augmentation du mouvement des molécules donc des chocs efficaces favorisant la réaction. Pour les cellules la température optimale est voisine de 37 °C ce qui est tout à fait favorable à ces collisions. Toutefois au-delà d'une certaine température, en particulier à partir de celles connues pour dénaturer les protéines, on observe une chute brutale de cette vitesse. L'enzyme perd son activité. ***La température optimale sera donc un compromis entre une température favorisant les chocs efficaces et une température pour laquelle la plupart des liaisons faibles, maintenant la conformation tertiaire de la protéine, ne sont pas détruites***. La valeur varie selon les enzymes. Par ailleurs quelques enzymes ont une très forte résistance à une élévation de température : c'est le cas d'enzymes dont la structure tertiaire est consolidée par de nombreux ponts disulfure (RNase, uréase). *Dans le cas de l'uréase, les*

liaisons disulfure protègent l'enzyme contre la dénaturation chimique ; l'urée, le substrat, est en effet un agent dénaturant.

Les réactions enzymatiques sont aussi très sensibles aux variations de *pH du milieu*. La courbe de la *figure II-52, B* montre l'influence de ces variations sur l'activité de trois enzymes, respectivement la pepsine (une protéase de l'estomac), la trypsine (une protéase du pancréas) et une cholinestérase. On sait que les pH extrêmes modifient l'ionisation du substrat et la dissociation des acides aminés : ils peuvent parfois modifier de façon irréversible une protéine en la dénaturant et provoquer une dissociation de l'apoenzyme et du coenzyme. Souvent l'enzyme n'est active que dans une marge de pH très étroite (cas de la pepsine et de la trypsine). En revanche la cholinestérase acquiert son activité quand le pH dépasse 6. En pratique les enzymes sont toujours utilisées dans un système tampon et on définit, là encore, un pH optimal comme la concentration en H^+ pour laquelle les groupes ionisables de l'enzyme et du substrat sont les plus favorables à l'activité enzymatique.

De ces observations il ressort que les enzymes ne peuvent fonctionner que dans des ***conditions compatibles avec le maintien de leur structure tertiaire, donc de leur structure géométrique et de leur conformation tridimensionnelle.*** Celle-ci semble donc impliquée dans le fonctionnement des systèmes enzymatiques.

b. Caractéristiques du site actif

Toutes les enzymes présentent un *site actif.* Pour en comprendre les caractéristiques les étapes de la catalyse vont être analysées séparément (bien qu'il n'existe en réalité aucun décalage dans le temps).

• **Reconnaissance**

Cette première étape est très importante et tout à fait caractéristique du monde biologique. À la différence des catalyseurs chimiques, les enzymes ont une *spécificité*, c'est-à-dire qu'elles reconnaissent une molécule ou parfois une classe de molécules. À titre d'exemple on peut comparer des réactions d'hydrogénation de carbones insaturés par voie chimique et par voie enzymatique.

Dans le cas d'une hydrogénation par *voie chimique (fig. III-53)* la catalyse est non spécifique, le nickel ou le platine pouvant être utilisés indifféremment. En fait les deux métaux sont couramment utilisés en industrie alimentaire pour l'hydrogénation des huiles végétales et la fabrication de graisses.

Au contraire les *catalyseurs enzymatiques* sont beaucoup plus spécifiques comme le montre l'exemple suivant de l'hydrogénation du fumarate *(fig. III-54)*. L'enzyme succinate déshydrogénase, qui catalyse la réaction d'hydrogénation du fumarate en succinate (elle est ainsi nommée car elle fonctionne généralement dans le sens de la déshydrogéna-

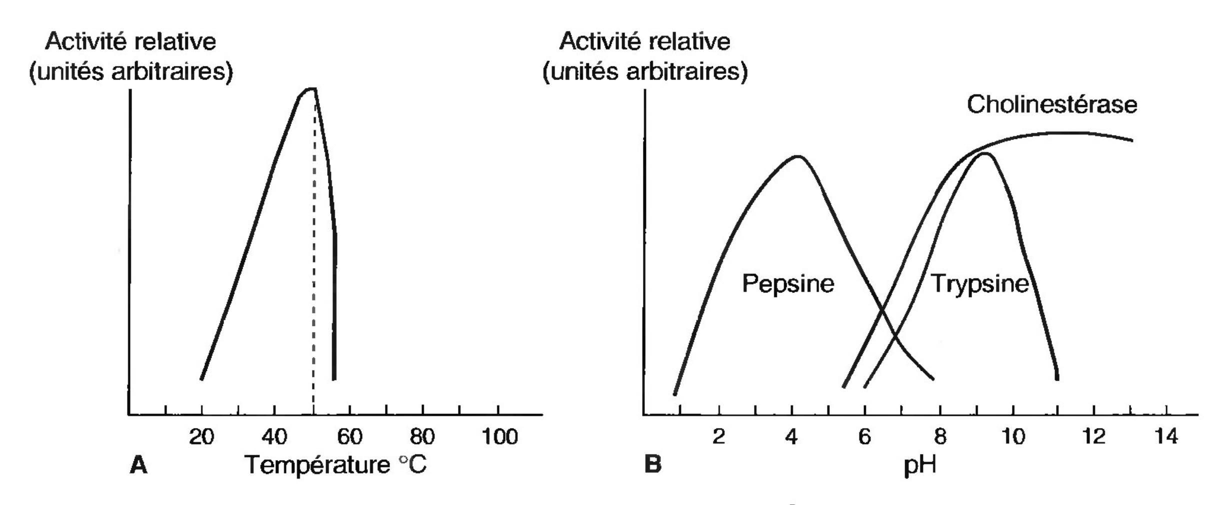


Fig. III-52 : Influence des conditions de l'environnement sur l'activité des enzymes.
A) Influence de la température.
B) Influence du pH.

tion), ne pourra catalyser l'hydrogénation du maléate qui est un stéréoisomère du fumarate. L'enzyme apparaît donc tout à fait *spécifique d'une molécule*.

Certaines enzymes hydrolysent une *classe de molécules*. C'est le cas de la β-galactosidase. L'enzyme reconnaît toute une famille de galactosides dans laquelle le résidu R peut être variable. En revanche l'enzyme ne pourra reconnaître les β-glucosides qui diffèrent des précédents par la seule position de l'OH sur le carbone C_4 *(fig. III-55)*.

D'autres enzymes enfin ont des *degrés de spécificité variables*. C'est le cas des peptidases qui catalysent la rupture des liaisons peptidiques des protéines. Parmi celles-ci la chymotrypsine catalyse l'hydrolyse, au niveau du carboxyle, de la tyrosine et de la phénylalanine, c'est-à-dire deux acides aminés aromatiques, alors que la trypsine catalyse l'hydrolyse, au niveau du carboxyle, de la lysine et de l'arginine, c'est-à-dire deux acides aminés à longue chaîne aliphatique. Dans les deux cas les acides aminés reconnus par la même enzyme ont une conformation, donc un encombrement, similaire, ce qui indique que l'enzyme ne reconnaît pas la liaison peptidique dont elle catalyse la rupture mais plutôt son

$$R{-}CH{=}CH{-}R' + H_2 \xrightarrow[Pt]{Ni} R{-}CH_2{-}CH_2{-}R'$$

Fig. III-53 : Hydrogénation de carbones insaturés par des catalyseurs inorganiques.

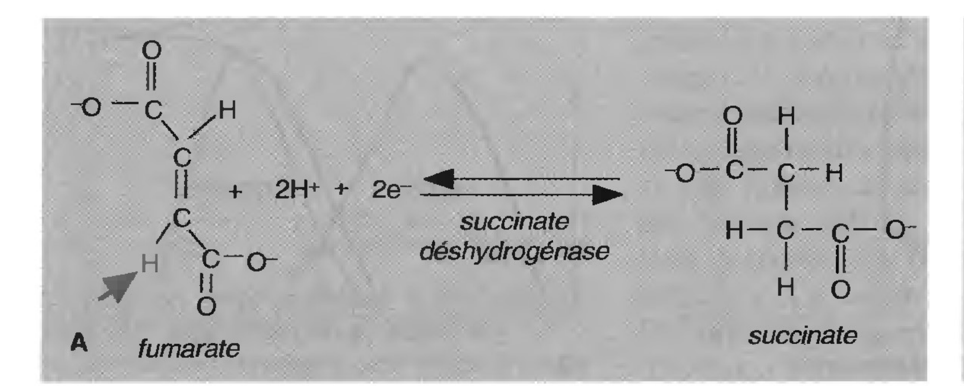
environnement immédiat. Au contraire les carboxypeptidases et aminopeptidases ont une spécificité beaucoup plus souple dans la mesure où ces enzymes catalysent l'hydrolyse des acides aminés terminaux quelle que soit leur nature.

Une question importante est de savoir si la reconnaissance et surtout l'ajustement de l'enzyme et du substrat sont dus à une parfaite complémentarité du substrat et du site actif, comme doivent être parfaitement ajustées une *clef et une serrure (fig. III-56)*. Il apparaît plutôt que, même si une complémentarité existe, elle est rarement parfaite. La protéine n'est pas rigide comme une serrure, mais au contraire très flexible et versatile. La fixation d'un substrat permettrait un changement conformationnel de l'enzyme lui conférant une meilleure complémentarité avec le substrat : c'est la théorie de l'*ajustement induit,* non prouvée définitivement, mais qui semble actuellement retenue.

- **Fixation, accrochage du substrat**

L'organisation du site actif est assurée par les repliements de la structure tertiaire de la protéine. Souvent des domaines formés d'hélices α et de feuillets plissés β constituent des *crevasses* ou des *sillons* dont la forme est très spécifique et dans lesquels peut se fixer le substrat *(fig. III-57)*.

Dans une enzyme on peut distinguer deux régions cruciales : une région qui reconnaît et fixe solidement le substrat, c'est le site de fixation, et une région qui catalyse la réaction après que le substrat a été fixé. Le plus sou-



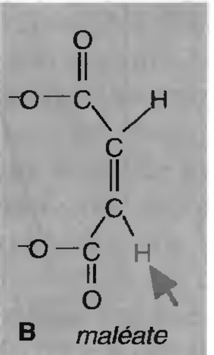


Fig. III-54 : Spécificité de la succinate déshydrogénase vis-à-vis de son substrat.
A) Hydrogénation du fumarate.
B) Le maléate qui est un stéréoisomère du fumarate n'est pas reconnu par l'enzyme.

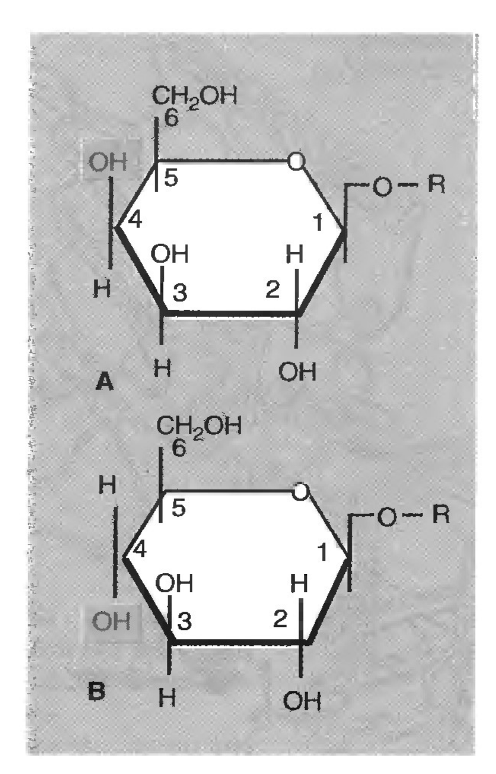


Fig. III-55 : Spécificité de la β-galactosidase pour la classe des galactosides.

A) β-galactoside. Le résidu R peut être variable.

B) β-glucoside non reconnu par la β-galactosidase.

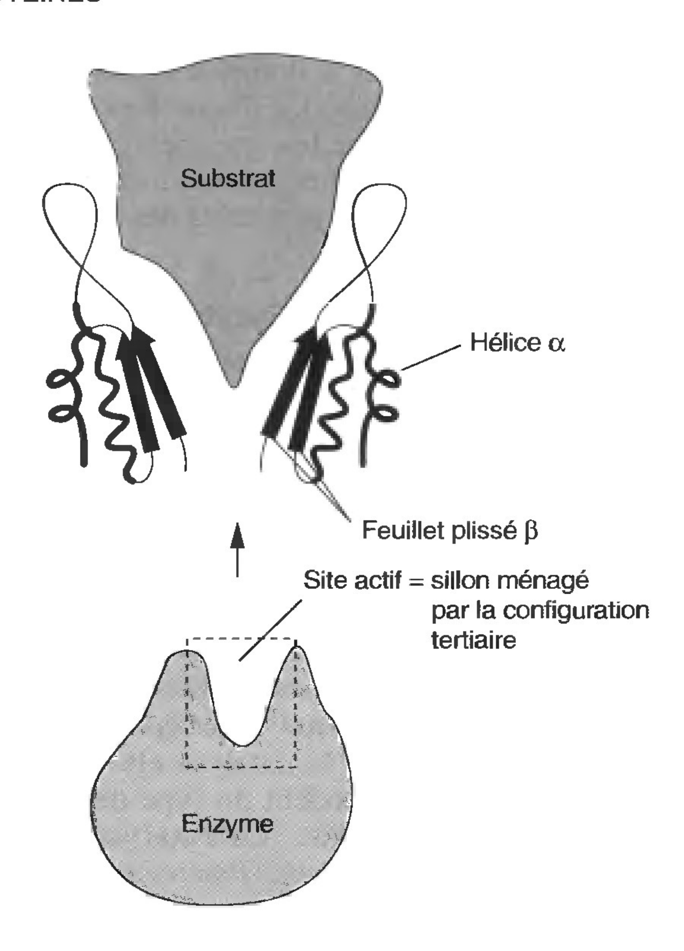


Fig. III-57 : Site actif et liaison enzyme-substrat.

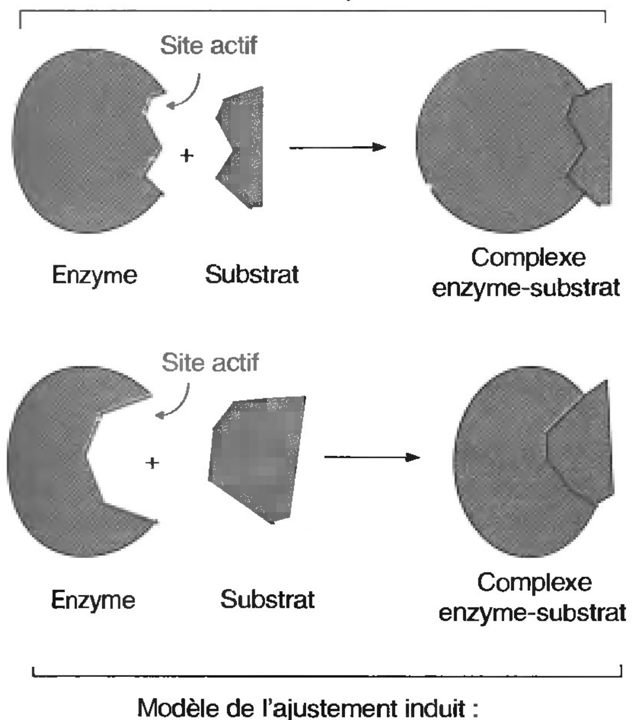


Fig. III-56 : Hypothèses sur l'ajustement de l'enzyme et du substrat.

vent les acides aminés qui participent à ces deux régions critiques ne sont pas voisins dans la chaîne mais rapprochés par le reploiement du polypeptide. Ainsi la *figure III-58, A* montre un exemple de protéine enzymatique, la D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, dans laquelle on peut reconnaître les groupements fonctionnels assurant la fixation du substrat. ***Le site actif apparaît donc comme un domaine tridimensionnel, correspondant souvent à une toute petite partie de la molécule et regroupant des résidus qui sont souvent éloignés dans la chaîne polypeptidique (structure primaire).***

La fixation du substrat dans le site actif se fait par des *liaisons faibles* (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, interactions de Van der Waals). Dans quelques cas des *liaisons covalentes transitoires* peuvent s'établir. La *figure III-58, B* montre les liaisons H établies entre certains groupements polaires d'un nucléotide de l'ARN et des groupements polaires de certains acides aminés de la ribo-

nucléase installés dans le domaine de fixation. Souvent l'eau est exclue des sillons. Les molécules d'eau entourant les groupes chargés diminuent en effet les interactions ; l'exclusion de l'eau rend donc plus probables des liaisons électrostatiques.

- **Réalisation de l'activité catalytique**

Cette étape dépend là encore de quelques acides aminés positionnés dans le site actif au niveau du domaine catalytique et qui peuvent interagir avec le substrat. Sur la *figure III-58, A* on peut reconnaître les acides aminés tapissant ainsi le site catalytique de la D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Il devient maintenant possible de dresser de véritables *cartes des sites catalytiques* des enzymes. Elles révèlent une grande ressemblance des sites catalytiques dans une même famille d'enzymes.

Les mécanismes de la catalyse elle-même sont variables et dépendent du type de réaction chimique impliqué. La catalyse peut résulter du seul effet de *positionnement* et de *rapprochement* dans le site actif de groupes chimiques capables de réagir. Elle peut être due à des *changements de conformation* susceptibles de déclencher une réaction. Dans certains cas la catalyse fait intervenir un *intermédiaire covalent* transitoire. La *figure III-59* illustre, à titre d'exemple, les étapes de la catalyse de l'ARN par une ribonucléase pancréatique. Dans ce dernier cas c'est l'intervention de groupements donneurs et/ou accepteurs de protons (ici deux groupements histidine du site actif) qui permet l'*hydrolyse par échange de protons :* il s'agit dans ce cas d'une *catalyse acide-base*.

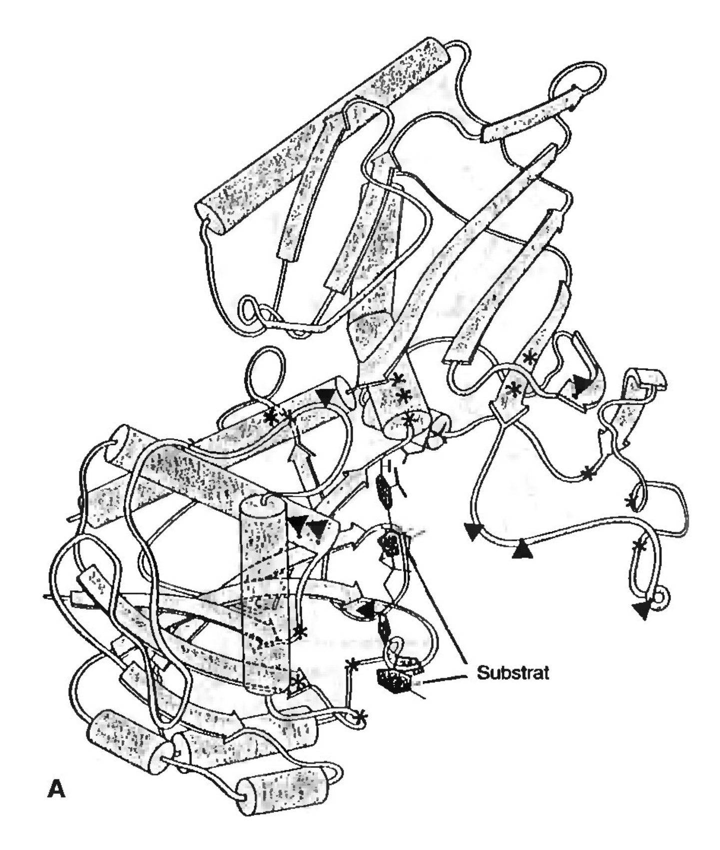
Dans tous les cas, c'est le rapprochement très précis, *à quelques Angströms de distance*, du substrat et des groupements actifs de l'enzyme qui permettra la réaction.

- **Séparation de l'enzyme et des produits de la réaction**

C'est le moment où,

$$(ES) \longrightarrow E + P$$

la rupture des liaisons chimiques du substrat ayant été réalisée au niveau du site catalytique, la complémentarité acquise lors de la



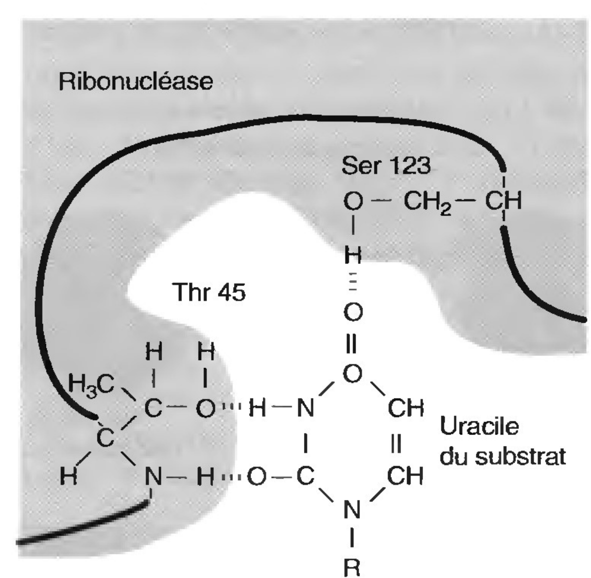


Fig. III-58 : Site actif et liaison enzyme-substrat.
A) Exemple de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. L'enzyme comprend deux domaines constitués d'hélices α et de feuillets β. Dans le site actif deux sortes de résidus peuvent être identifiés. ▼ : groupements fonctionnels à activité catalytique ; ✳ : groupements fonctionnels assurant la fixation du substrat.
(Modifié d'après J. PELMONT. Enzymes. 1989 [schéma page 78]. Collection Grenoble Sciences, Presses Universitaires de Grenoble.)
B) Exemple de la ribonucléase. Des liaisons hydrogène assurent la fixation du substrat (un nucléotide de l'ARN) sur les résidus thréonine 45 et sérine 123.

Fig. III-59 : Mécanismes de l'hydrolyse de l'ARN par une ribonucléase pancréatique.

A) Organisation du site actif de la ribonucléase. Parmi les résidus impliqués dans une hydrolyse par échanges de protons, l'histidine 12, déprotonée, est un accepteur de protons, et l'histidine 119, protonée, est un donneur de protons. La lysine 41, chargée, retient le substrat.

B) His-12 arrache un proton sur l'hydroxyle porté par C'2 du ribose et devient chargé +. L'oxygène du C'2 devenu anionique établit une liaison avec le phosphore voisin et il se forme une structure phosphodiester cyclique.

C) La chaîne d'ARN est rompue. His-119 cède un proton. Intervention d'un OH- du solvant.

D) Ouverture du cycle diester créant un ester terminal en 3'. His-12 restitue son proton à l'extrémité de l'ARN. His-119 récupère un proton à partir de l'eau.

E) Fin de la catalyse.

(Modifié d'après J. PELMONT. Enzymes. 1989 [schéma pages 199 et 200]. Collection Grenoble Sciences, Presses Universitaires de Grenoble.)

fixation du substrat est perdue, les produits sont libérés et l'enzyme reprend sa conformation initiale.

c. Inhibition de l'activité enzymatique

Des composés chimiques très nombreux peuvent intervenir pour inhiber les réactions enzymatiques. L'inhibition peut être de 2 types :

– **inhibition réversible.** L'inhibiteur se fixe de façon réversible, non définitive, sur le site actif ou dans une autre région de l'enzyme (entraînant ainsi une déformation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme et plus particulièrement du site actif de celle-ci) ;

– **inhibition irréversible.** L'inhibiteur se fixe sur l'enzyme par des liaisons fortes (liaisons covalentes). L'inhibition est définitive.

• **Inhibition réversible**

Les *analogues structuraux* sont des composés conduisant à ce type d'inhibition. Ce sont des substances qui ont une ressemblance, une analogie stérique, avec le substrat. L'analyse de leur action est intéressante d'un double point de vue : ils aident à mieux comprendre le fonctionnement enzymatique et ils sont à la base de la fabrication de nombreux médicaments.

Souvent l'analogue structural contracte avec l'enzyme des liaisons labiles. L'association enzyme-inhibiteur est donc une association provisoire. La *figure III-60* montre la compétition possible entre le substrat et l'inhibiteur pour « occuper » le site actif de l'enzyme. On désigne souvent ces inhibiteurs sous le vocable ***d'inhibiteurs compétitifs***.

Deux réactions se produisent simultanément :

$$E + S \longrightarrow (ES) \longrightarrow E + P$$
$$E + I \longrightarrow (EI)$$

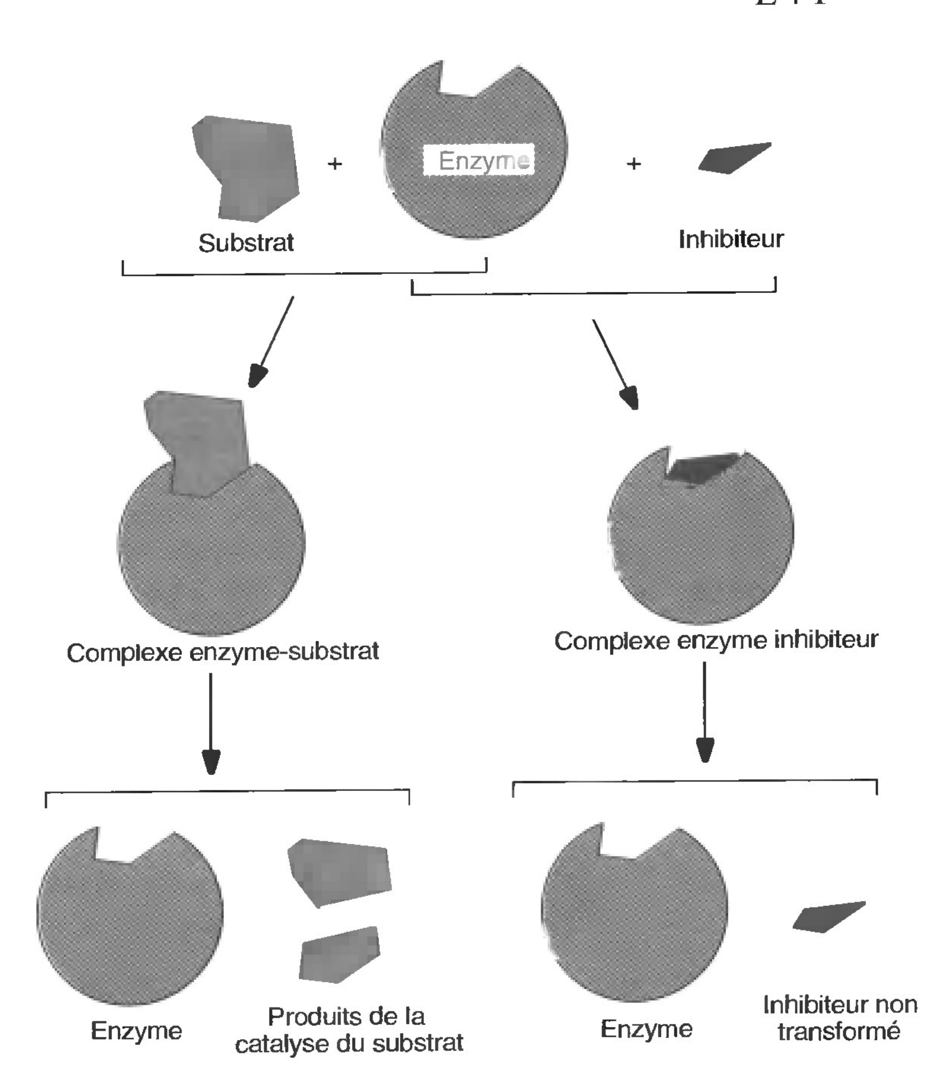


Fig. III-60 : Inhibition compétitive.

Si la concentration en substrat est supérieure à la concentration en inhibiteur, la réaction catalytique reste possible. Au contraire si la concentration en inhibiteur est la plus grande, l'enzyme devient inactive vis-à-vis de son substrat. Il est possible de suivre sur la *figure III-61* la cinétique d'une enzyme en l'absence d'inhibiteur et en présence d'inhibiteur à faible et forte concentration. Plus la concentration en inhibiteur est importante, plus il faut une grande quantité de substrat pour obtenir la vitesse maximum. La valeur du K_m est augmentée.

De nombreux inhibiteurs compétitifs des enzymes ont été développés. Un exemple classique est celui des *sulfamides*, employés en thérapie antibactérienne dans les années 1930 avant le développement des antibiotiques et encore utilisés actuellement. Les sulfamides sont des analogues structuraux de l'acide para-aminobenzoïque (PAB), précurseur de l'acide folique, composé indispensable à la croissance des populations bactériennes *(fig. III-62)*. L'enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide folique à partir de ce substrat est « trompée », fixe les sulfamides ce qui empêche les bactéries de proliférer. Dans ce cas les sulfamides sont de véritables bactériostatiques dont l'intérêt en thérapie humaine était qu'ils pouvaient être utilisés à fortes doses car ils ont peu d'action sur les cellules de l'homme (l'homme ne synthétise pas d'acide folique). La recherche d'inhibiteurs compétitifs est aussi largement à la base des fabrications d'*antimétabolites* utilisés dans la lutte contre certains cancers.

Le curare, substance extraite d'une plante d'Amérique du Sud utilisée dans la fabrication des « flèches empoisonnées » et en anesthésie chirurgicale lorsque l'immobilité musculaire du patient est requise, est un autre exemple d'inhibition réversible dans lequel l'inhibiteur entre en compétition avec le récepteur de l'acétylcholinestérase (voir p. 155).

D'autres inhibiteurs peuvent *se fixer de façon réversible dans une région différente du site actif* (formation d'un complexe ESI). Il s'agit dans ce cas d'***inhibiteurs non compétitifs***. La présence de l'inhibiteur entraîne une distorsion du site actif et une diminution de l'activité catalytique de l'enzyme.

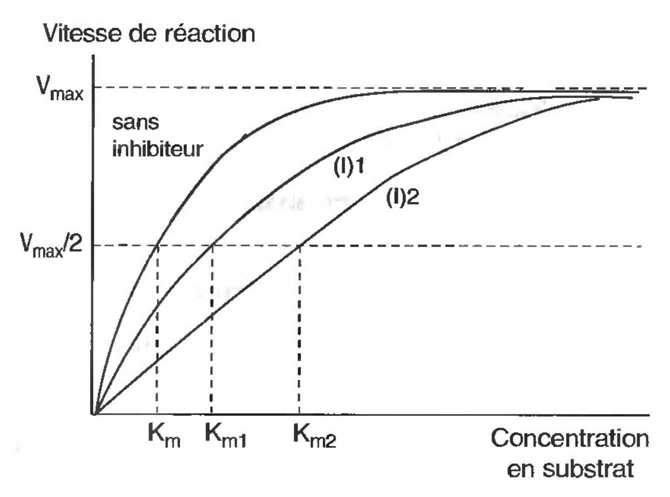
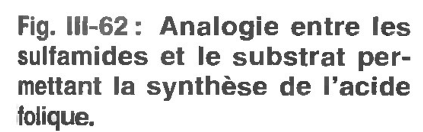
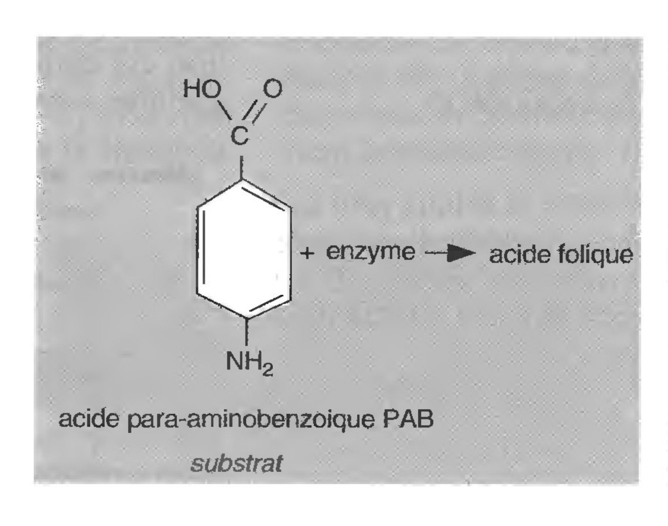


Fig. III-61 : Cinétique enzymatique en présence d'inhibiteur.
(I)1 : faible concentration en inhibiteur;
(I)2 : forte concentration en inhibiteur.





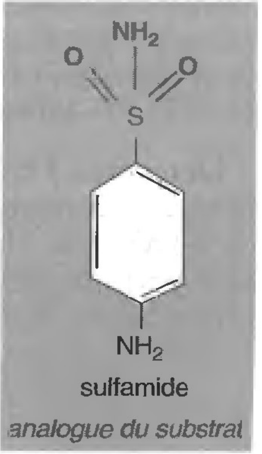


Fig. III-62 : Analogie entre les sulfamides et le substrat permettant la synthèse de l'acide folique.
A) Substrat : acide para-aminobenzoïque ou PAB.
B) Sulfamide, analogue structural du substrat.

- **Inhibition irréversible**

Le cas le plus général est celui d'inhibiteurs n'ayant pas d'analogie stérique avec le substrat, mais qui se fixent de façon irréversible sur le site actif ou sur une autre partie de la molécule. C'est le cas de nombreux insecticides, de composés développés dans des stratégies de guerre comme gaz de combats. Par exemple on connaît bien l'action du DIFP (diisopropyl-fluorophosphate), gaz de combat qui se fixe par liaison covalente dans le site actif de la cholinestérase, enzyme impliquée dans la transmission de l'influx nerveux de certaines jonctions neuromusculaires *(fig. III-63)*. La transmission de l'influx est ainsi bloquée provoquant une mort très rapide par arrêt des mouvements respiratoires et des mouvements cardiaques.

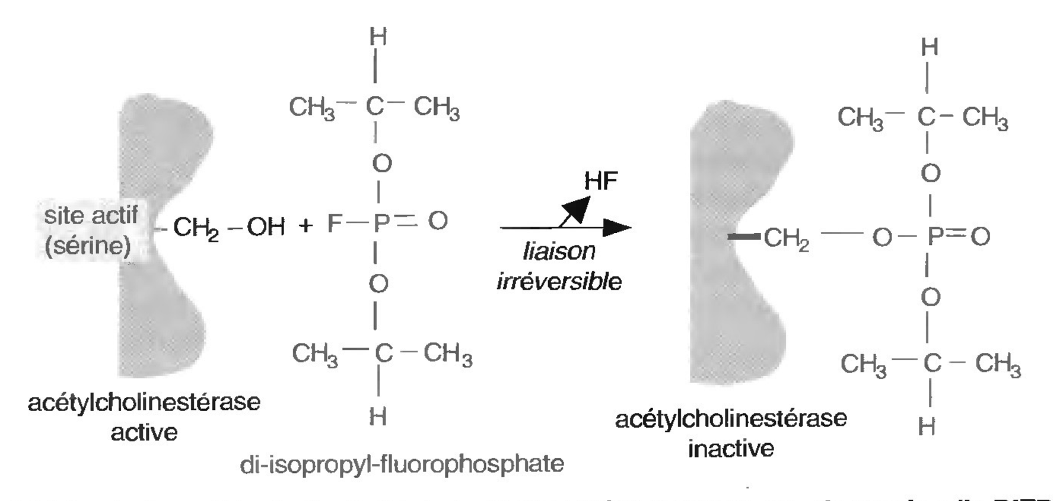


Fig. III-63 : Inhibition irréversible de l'activité de la cholinestérase par un gaz de combat (le DIFP).

E. Régulation de l'activité des enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs beaucoup plus actifs que les catalyseurs chimiques. La cellule, pour s'adapter à ses besoins et pour éviter le désordre, c'est-à-dire aussi bien l'engorgement que le manque de substrats et de produits de réaction, doit évidemment mettre sous contrôle tout son équipement enzymatique.

Plusieurs moyens sont possibles :

a. Régulation de la production des enzymes

En réponse à un stimulus la cellule peut soit induire, soit réprimer la synthèse d'une seule ou d'une série d'enzymes *(fig. III-64)*. C'est un aspect très important qui sera abordé dans le chapitre V, 2[e] partie.

b. Contrôle par phosphorylation

L'accrochage d'acide phosphorique sur une enzyme la rend active. Il sera vu ultérieurement (chap. VIII, 2[e] partie) que la cellule dispose d'un crédit d'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate). Sous l'action d'un stimulus une protéine kinase permet la phosphorylation d'une enzyme la rendant ainsi active. Quand la cellule n'a plus besoin de l'activité de cette enzyme une phosphatase agit dans le sens inverse rendant ainsi l'enzyme inactive *(fig. III-65)*. Cette régulation est extrêmement rapide, de l'ordre de quelques secondes.

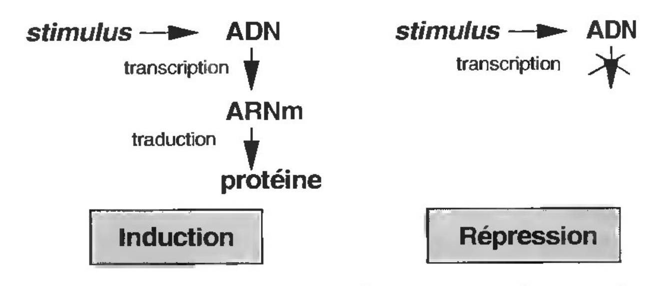


Fig. III-64 : Induction et répression, deux voies dans la régulation de la synthèse des enzymes.

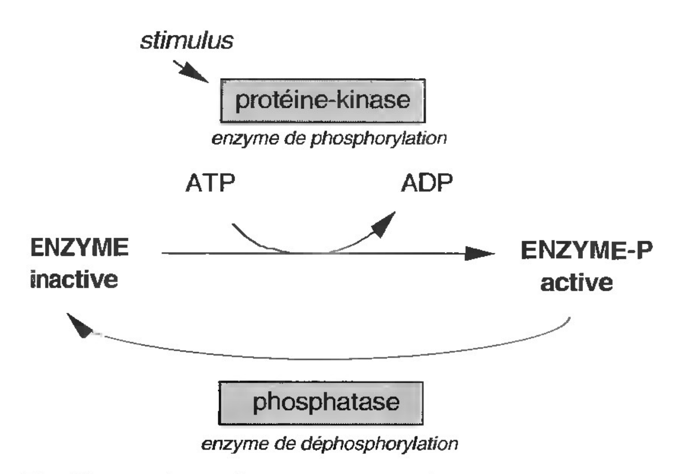


Fig. III-65 : Contrôle de l'activité enzymatique par phosphorylation.

c. *Régulation par activation de précurseurs*

Beaucoup d'enzymes sont sécrétées sous une forme inactive. C'est le cas de nombreuses enzymes des cellules du pancréas qui sont synthétisées le long du flux membranaire sous des formes inactives rassemblées dans les grains de zymogène (étymologiquement *qui génère les enzymes*). On connaît ainsi le chymotrypsinogène précurseur de la chymotrypsine, le trypsinogène, précurseur de la trypsine. Lors de la libération à l'extérieur des cellules, les protéines subissent des modifications post-traductionnelles qui les rendent actives. Ce point sera détaillé dans le chapitre VII, 2e partie.

d. *Contrôle allostérique de l'activité enzymatique*

Ce contrôle concerne l'*activité de l'enzyme*. Un exemple classique est celui de l'activité de la *thréonine désaminase* dans la bactérie *Escherichia coli*. Cette enzyme E_1 intervient au cours de la première étape de la chaîne de biosynthèse de l'isoleucine à partir de la L-thréonine *(fig. III-66)*.

Si dans un tel système on analyse la vitesse de réaction en fonction de la quantité de L-thréonine, c'est-à-dire du substrat de la thréonine désaminase, la courbe est différente de celle habituellement obtenue (cinétique michaélienne, voir p. 73). Quand la concentration en substrat est faible la vitesse de réaction reste d'abord faible, non proportionnelle à l'augmentation en substrat. Puis la vitesse augmente de façon accélérée, donnant ainsi une courbe sigmoïde caractéristique *(fig. III-67)*. Tout se passe comme si, lorsqu'il y a peu de thréonine, la bactérie ne la transforme pas de façon à ne pas épuiser son stock de substrat. En revanche, lorsque la concentration en thréonine augmente, la vitesse augmente très rapidement et la synthèse d'isoleucine, produit final de la chaîne de biosynthèse, est ainsi accrue.

La thréonine désaminase est une protéine globulaire à structure quaternaire. Elle comporte 4 protomères (de masse moléculaire 40000 chacun). Il a été montré que le comportement inhabituel de cette enzyme était dû à un ***effet coopératif*** de ces protomères (comparer avec le comportement de l'hémoglobine, voir p. 60). La fixation d'une molécule de substrat sur un protomère est d'abord difficile mais, lorsqu'elle est effectuée, un changement de conformation du protomère est réalisé et ce *changement de conformation ou allostérie* facilite la fixation du substrat sur les autres protomères de l'enzyme. Le substrat est donc un *effecteur allostérique* jouant ici un rôle d'***activateur***. Lorsque l'enzyme est traitée par la chaleur de façon à dissocier les protomères liés par des liaisons faibles, l'effet coopératif est perdu, et la cinétique enzymatique redevient michaélienne *(fig. III-67)*.

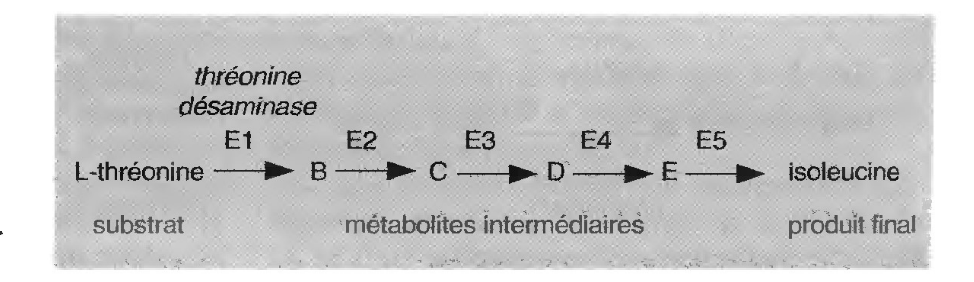


Fig. III-66 : Chaîne de biosynthèse de l'isoleucine.

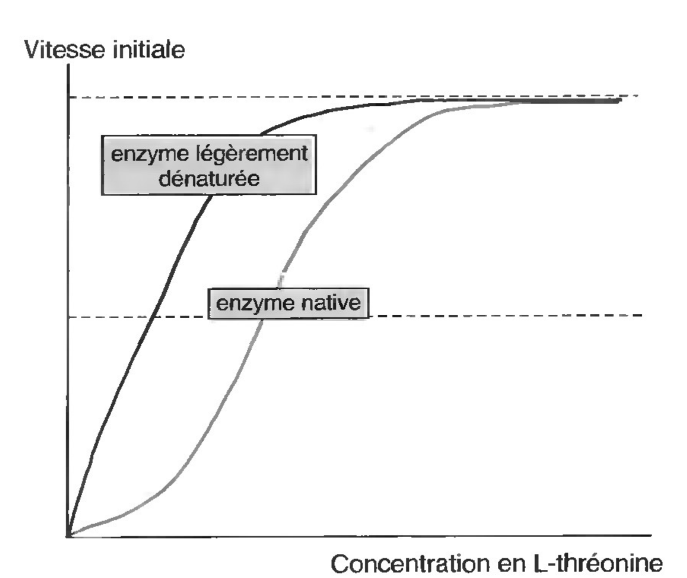


Fig. III-67 : Cinétique de la thréonine désaminase en fonction de la quantité de substrat.
En présence d'enzyme native (courbe en rouge) la courbe a une forme sigmoïde. En présence d'enzyme légèrement dénaturée par la chaleur (courbe en noir), c'est-à-dire dont les protomères sont séparés, la courbe a une forme michaélienne.

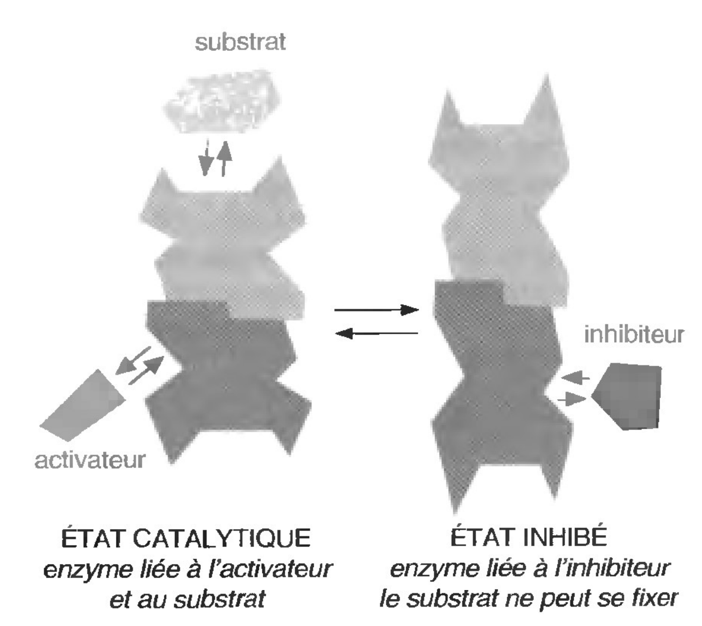


Fig. III-69 : Transition allostérique d'une enzyme formée de deux protomères possédant chacun un site catalytique, un site activateur ou inhibiteur.

Beaucoup d'enzymes allostériques peuvent être par ailleurs inhibées par le produit final de la réaction. C'est le cas de la thréonine désaminase qui subit une *rétro-inhibition* par action de l'isoleucine. Le mécanisme de cette inhibition est symétrique de l'activation et suggère là encore une coopérativité allostérique. Le produit final de la chaîne de biosynthèse est encore un *effecteur allostérique* qui joue ici le rôle d'*inhibiteur* (*fig. III-68*).

Il faut admettre que l'enzyme thréonine désaminase, comme d'autres enzymes à structure quaternaire, comporte au moins *deux sites régulateurs*, l'un pour la fixation du substrat, c'est le *site actif* de l'enzyme, l'autre pour la fixation de l'inhibiteur, c'est le *site régulateur* (*fig. III-69*). Lorsque les sites sont occupés ils déclenchent une transition allostérique dont va dépendre le comportement enzymatique.

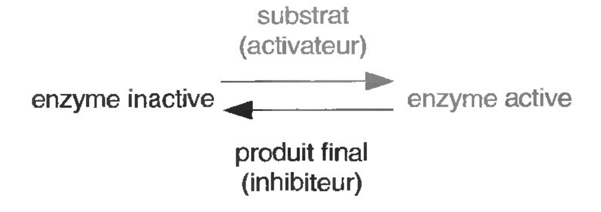


Fig. III-68 : Activation et rétro-inhibition.

2.3. LES ANTICORPS, PROTÉINES GLOBULAIRES À RÔLE DE DÉFENSE

Les anticorps, ou immunoglobulines (Ig) sont les molécules de défense présentes chez tous les Vertébrés. Elles reconnaissent les antigènes, c'est-à-dire toutes les molécules étrangères à l'organisme. Ce sont les molécules qui nous défendent de la mort par infection quand les barrières de protection chimiques et mécaniques ont été franchies accidentellement. Leur production résulte du déclenchement d'une réponse immunitaire (*fig. III-70*).

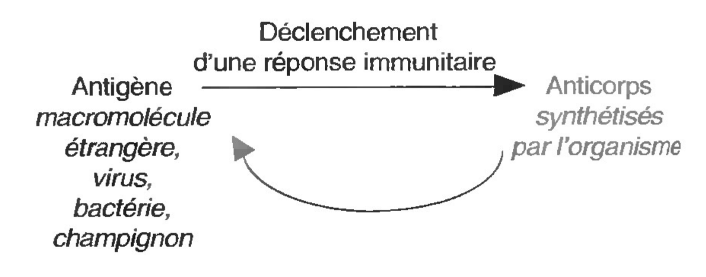


Fig. III-70 : Production des anticorps.

A. La réponse immunitaire. Quelques rappels

Les cellules responsables de l'immunité sont les *lymphocytes* présents dans le sang et dans le système lymphatique (thymus, rate, appendice et ganglions lymphatiques). Tous les lymphocytes sont issus de cellules souches localisées dans le foie chez l'embryon et dans la moelle osseuse chez l'adulte. Sans entrer dans les détails de la réaction immunitaire qui est très complexe, on peut reconnaître deux types de réponses à l'introduction d'un antigène :

– une réponse de **type humoral** qui conduit à la production d'anticorps circulants. Ils sont synthétisés et libérés par une catégorie de lymphocytes, les *lymphocytes B*. Ces anticorps se lient de façon spécifique à l'antigène, entraînant une cascade d'événements conduisant à la destruction de ce dernier ;

– une réponse à **médiation cellulaire**, permettant la production de cellules spécialisées, tueuses, globalement appelées *lymphocytes T*.

Le plus souvent les deux réponses sont mêlées. Seule sera envisagée ici la réponse de type humoral conduisant à la synthèse des anticorps.

Une question importante est de connaître la *nature des antigènes*. L'infection est en général apportée par un virus, une bactérie, un champignon ou un protozoaire, mais théoriquement la plupart des macromolécules sont virtuellement des antigènes : (glyco)protéines, (glyco)lipides, glucides, acides nucléiques. En fait seule une petite partie de l'antigène sera reconnue par l'anticorps : il s'agit du *déterminant antigénique (ou épitope)*, un microorganisme ou une même macromolécule pouvant porter plusieurs épitopes différents.

La présence d'un antigène déclenche l'activation des lymphocytes B. Chez l'homme cette activation se déroule sur 5 jours au cours desquels 8 générations de cellules se développent *(fig. III-71)*. Au départ le lymphocyte B est dit vierge. Il est de petite taille et contient une petite quantité de cytoplasme. Ses caractères cytologiques sont ceux d'une cellule inactive. L'activation s'accompagne d'une augmentation de taille et surtout d'une importante synthèse de réticulum endoplasmique rugueux et de dictyosomes. À l'état activé la cellule est devenue un *plasmocyte*, cellule en phase de synthèse très active d'anticorps. On estime qu'un plasmocyte sécrète des anticorps à raison de 2000 molécules par seconde.

Dans chaque organisme les lymphocytes B forment des clones de cellules vierges destinées à produire un anticorps spécifique ; seulement un petit nombre sera activé pendant la vie d'un organisme ; ce sont les lymphocytes rencontrant les antigènes contre lesquels ils doivent diriger des anticorps. C'est la théorie de la *sélection clonale*, proposée il y a 50 ans, selon laquelle un organisme possède une énorme collection de clones différents. La conséquence est pour l'organisme la possibilité de « répondre » spécifiquement à des milliers d'antigènes différents (voir aussi, 2e partie, chapitre V).

B. Structure et mode d'action des anticorps

Il existe chez les Vertébrés 5 classes d'anticorps : les IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Seuls seront considérés ici les IgG qui constituent la classe prédominante des anticorps présents dans le sang (80 %).

a. La structure des anticorps

Une molécule d'anticorps est constituée : 1) de deux chaînes polypeptidiques légères (*chaînes L*, de *light*, léger). Elles sont identiques et ont chacune une masse moléculaire de 23000 Da environ ; 2) de deux chaînes lourdes (*chaînes H*, de *heavy*, lourd). Elles sont identiques et ont chacune une masse moléculaire de 52000 Da environ.

La molécule est symétrique puisque les deux branches du Y, formées chacune par l'association d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, sont identiques.

On peut reconnaître dans cette molécule les différents niveaux d'organisation d'une protéine précédemment décrits :

– une *structure primaire*. L'extrémité N-terminale correspond à la partie de la molécule où se fixera l'antigène. La séquence comprend

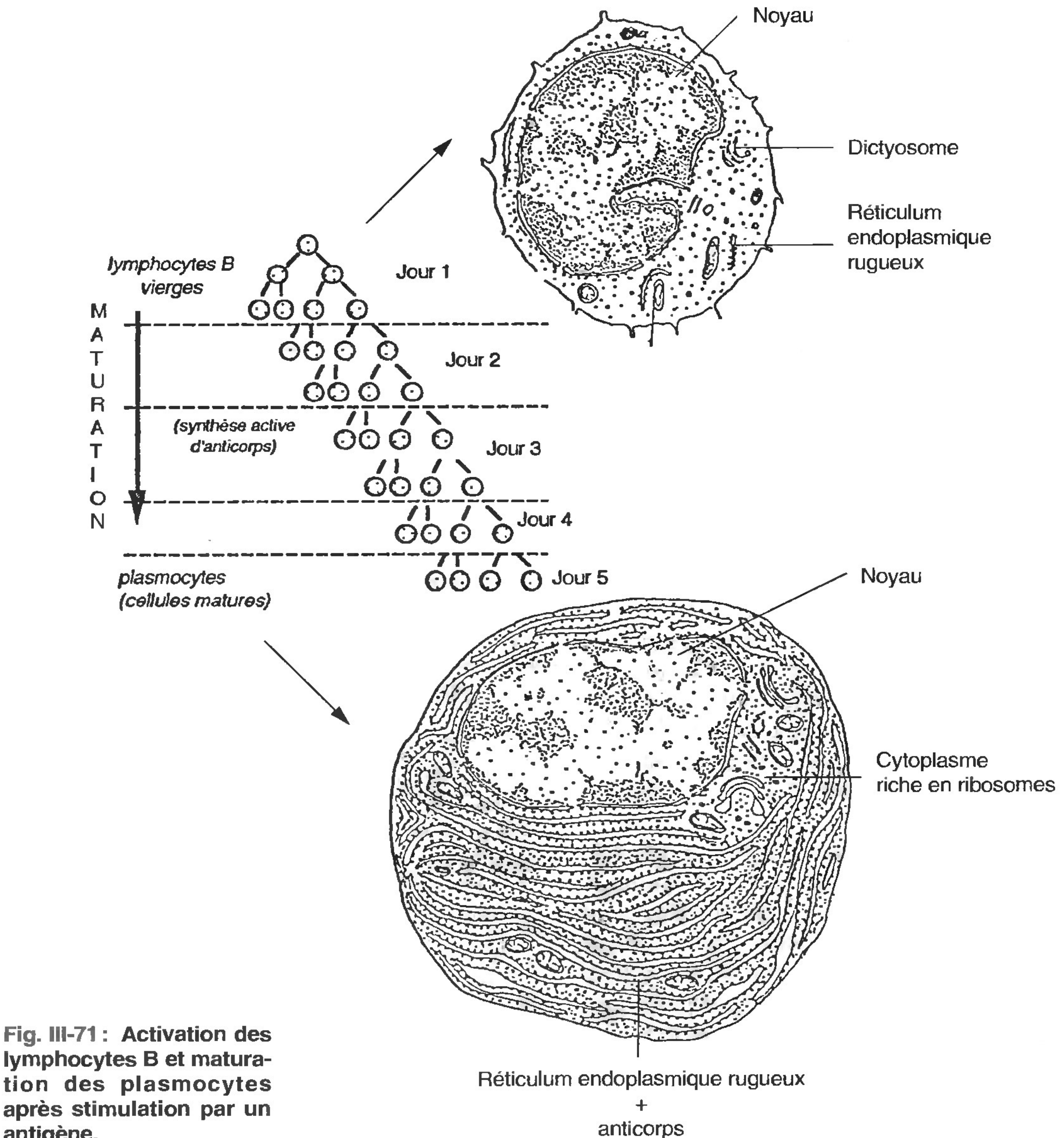


Fig. III-71 : Activation des lymphocytes B et maturation des plasmocytes après stimulation par un antigène.

220 acides aminés environ pour les chaînes L et 440 acides aminés environ pour les chaînes H. À l'extrémité N-terminale une séquence de 110 acides aminés constitue une *région variable* sur les quatre chaînes (respectivement V_H et V_L pour les chaînes lourdes et légères), alors que le reste des séquences constitue les *régions constantes* (respectivement C_H et C_L pour les chaînes lourdes et légères) *(fig. III-72)*.

Dans les parties constantes des chaînes lourdes, des motifs glucidiques sont liés au squelette protéique : ***les immunoglobulines G sont donc des glycoprotéines.***

– une *structure secondaire*. Dans les chaînes polypeptidiques existent des unités de pliage (ou *domaines*) indépendantes, dans lesquelles les chaînes polypeptidiques sont antiparallèles et ont une structure plissée en *feuillet β* caractéristique. Les 4 polypeptides

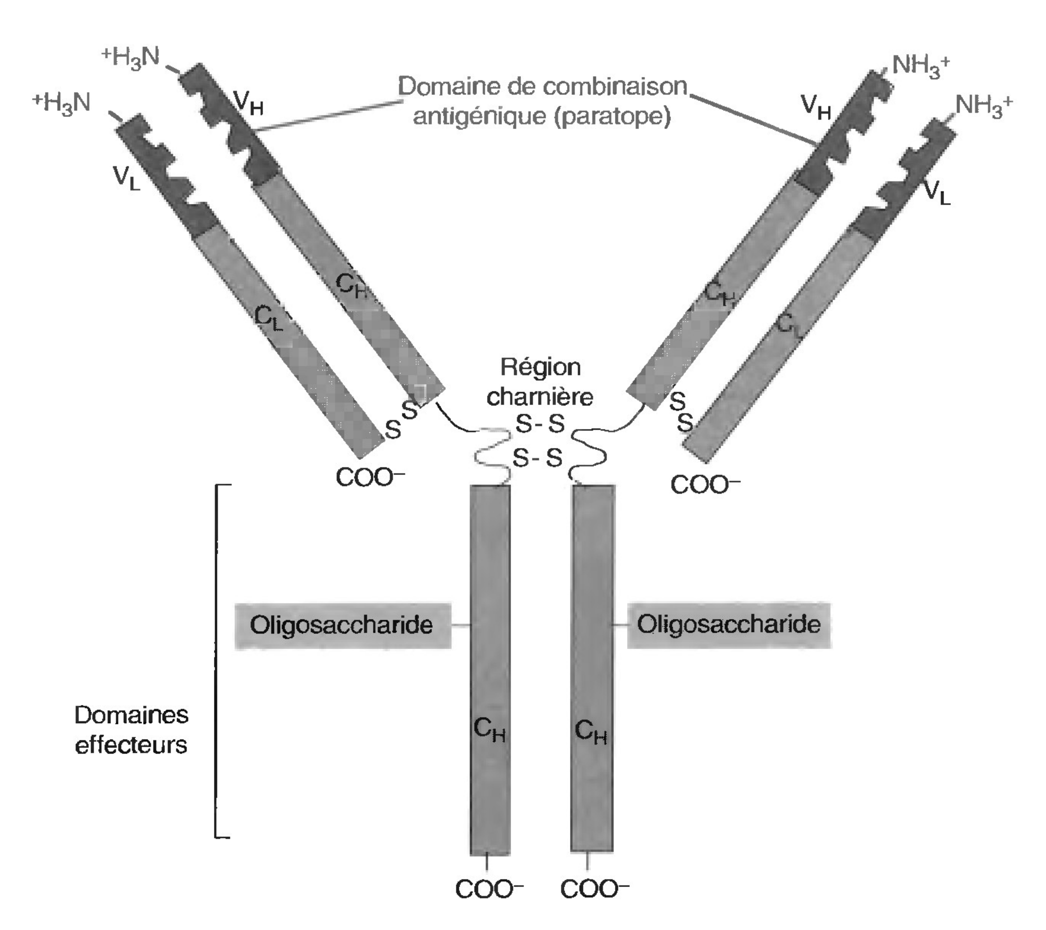


Fig. III-72 : Structure d'une immunoglobuline G (IgG).
C_H : domaine constant de la chaîne lourde ; V_H : domaine variable de la chaîne lourde ; C_L : domaine constant de la chaîne légère ; V_L : domaine variable de la chaîne légère.

apparaissent donc comme un chapelet de domaines séparés par des régions charnières. Une zone flexible sépare les deux régions de chaque chaîne L *(fig. III-73, A)*.

– une *structure tertiaire et quaternaire*. L'anticorps adopte une conformation tridimensionnelle caractéristique qui est consolidée par des liaisons disulfure établies entre les groupements –SH des résidus de cystéine des différentes chaînes. Certaines de ces liaisons sont *intracaténaires* et sont donc responsables de la structure tertiaire de la molécule. D'autres liaisons disulfure (ainsi que des liaisons non covalentes) sont *intercaténaires* et unissent les chaînes différentes. Bien que la structure quaternaire soit habituellement définie comme une association de protomères, identiques ou non, liés par des liaisons faibles, les anticorps présentent donc un niveau hiérarchique de structure de type quaternaire. La molécule possède globalement une forme en Y *(fig. III-73, B)*.

Les anticorps présentent deux régions importantes qui peuvent être séparées par des enzymes protéolytiques. La *figure III-74* montre par exemple l'action de la papaïne qui sépare :

– le *fragment Fab* (de l'anglais *antigen binding fragment)*, c'est-à-dire le fragment qui se lie à l'antigène. Il y a deux fragments Fab par immunoglobuline G ;

– le *fragment Fc*, fragment facilement cristallisable, homogène pour tous les anticorps d'une même famille, qui est capable d'interagir avec des phagocytes et avec des protéines du sérum impliquées dans la destruction des complexes antigène-anticorps. C'est le *domaine effecteur* de l'anticorps (voir plus loin).

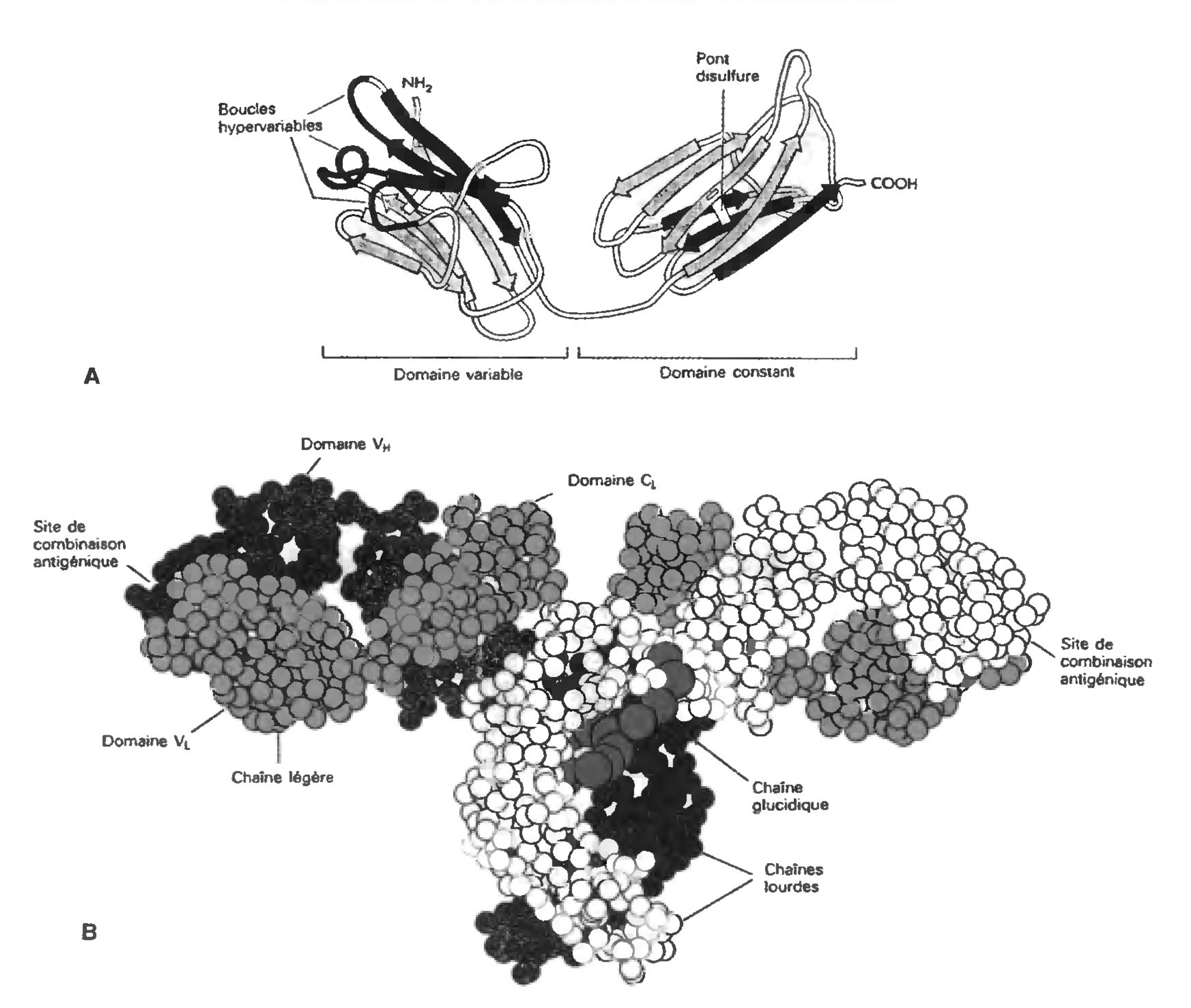


Fig. III-73 : Structure secondaire et organisation tridimensionnelle d'une molécule d'anticorps.
A) Organisation d'une chaîne légère comportant deux unités de pliages (domaines) indépendantes dans lesquelles les chaînes polypeptidiques sont organisées en feuillets β.
B) Organisation tridimensionnelle d'une molécule d'IgG.
(Reproduction des figures 23-16 et 23-17 de J.D. WATSON, N.H. HOPKINS, J.M. ROBERTS, J.A. STEITZ, A. WEINER. Biologie moléculaire du gène, 4e édition, InterEditions, 1989.)

b. Configuration du site actif

La connaissance des séquences et de la structure tridimensionnelle des anticorps est restée longtemps difficile en raison de la présence dans le sérum de nombreux anticorps dirigés contre des antigènes différents. Il était donc difficile d'obtenir des fractions suffisamment pures et suffisamment abondantes à des fins d'analyse. Des progrès considérables ont été obtenus dans les dernières décennies à partir de tumeurs de patients atteints de *myélomes*, c'est-à-dire de tumeurs cancéreuses produisant de grandes quantités d'anticorps purs.

Deux points sont à souligner :

– il a été vu que chaque anticorps possède deux sites de fixation pour un antigène (ou *paratopes*). Ces sites de fixation correspondent à la région variable des 4 chaînes polypeptidiques. En fait la variabilité n'est pas uniforme dans ces régions. Elle est distribuée dans 3 segments par chaîne appelés *régions hypervariables* (voir *fig. III-73, A*). Les séquences plus conservées qui les séparent constituent les *régions armature* ;

– dans les régions hypervariables seuls quelques résidus d'acides aminés forment des *boucles hypervariables* qui vont constituer les

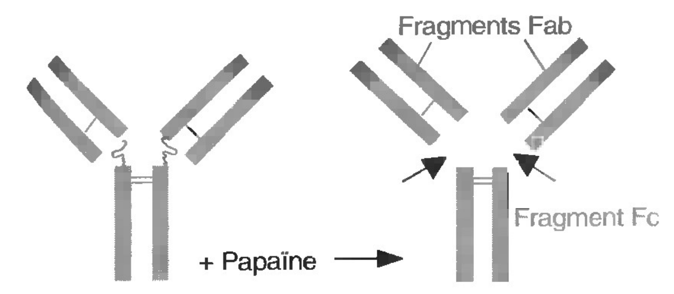


Fig. III-74 : Action de la papaïne sur un anticorps.

sites de combinaison antigénique. La spécificité de l'interaction antigène-anticorps dépend de la séquence primaire de ces régions et donc de la conformation tridimensionnelle localement organisée des cavités où va se fixer l'antigène *(fig. III-75)*.

Cette forme d'organisation autorise une grande variabilité des sites de liaison. En effet, pour chacun de ces derniers, il y a 6 boucles hypervariables (3 pour la chaîne légère, 3 pour la chaîne lourde) ; si on suppose que seulement 5 acides aminés par boucle sont susceptibles d'être modifiés (soit 30 par site), chacun d'entre eux pouvant être remplacé par un quelconque des 20 acides aminés courants, il y a 20^{30}, donc $1{,}07.10^{39}$ combinaisons possibles ou $1{,}07.10^{39}$ molécules d'anticorps potentiels. Chacune des cellules produisant l'une de ces combinaisons pouvant être à l'origine d'un clone, on comprend que chaque épitope d'un antigène puisse trouver un anticorps ayant un site de liaison qui lui soit complémentaire.

c. *Nature des liaisons antigène-anticorps*

On peut comparer le mode de liaison antigène-anticorps au mode de liaison enzyme-substrat analysé dans ce chapitre. Si on décompose artificiellement les événements, les premières « étapes » apparaissent similaires, les différences intervenant lorsque le complexe antigène-anticorps a été formé.

- **Reconnaissance**

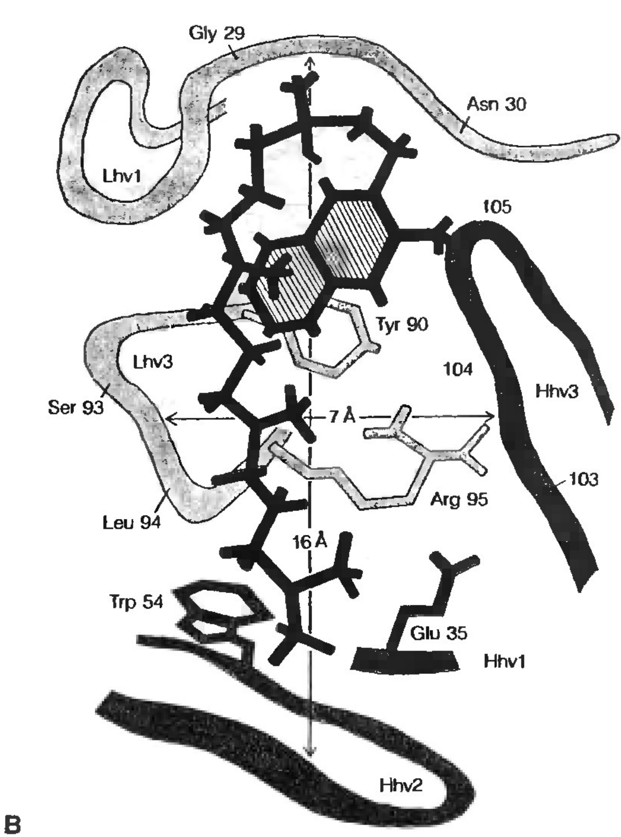
Comme pour les protéines enzymatiques, la reconnaissance antigène-anticorps est une conséquence d'un ***ajustement stéréo-spécifique***. L'affinité dans l'ajustement des deux protagonistes dépend, comme il vient d'être vu, de la conformation tridimensionnelle des sites de combinaison *(fig. III-75, B)*.

Boucles hypervariable

Domaines variables

Domaines constants

A



B

Fig. III-75 : Conformation du site antigénique.

A) Trois boucles hypervariables dans les deux chaînes organisent une cavité où peut se fixer l'antigène.

B) Rôle des boucles hypervariables pour la fixation de l'antigène (ici un dérivé de la vitamine K). En grisé clair : boucles hypervariables de la chaîne légère Lhv1 et Lhv3 ; en grisé sombre : boucles hypervariables de la chaîne lourde Hhv1, Hhv2 et Hhv3.

(Reproduction de la figure 22-16 de W.M. BECKER. The world of the cell. Menlo Park : The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc., 1986 : 1-882.)

- **Fixation et accrochage de l'antigène**

Comme pour les interactions enzyme-substrat, l'accrochage antigène-anticorps se fait par des liaisons faibles et réversibles (liaisons hydrophobes, liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals, interactions ioniques). Il se forme ainsi un complexe antigène-anticorps (Ag-Ac) que l'on appelle un *complexe immun*.

Chaque anticorps – au moins en ce qui concerne les IgG – possède 2 sites de fixation pour l'antigène. Il est donc divalent et peut se lier à plusieurs antigènes *(fig. III-76)*. ***Les anticorps sont donc symétriques et chaque branche du Y possède le même site de reconnaissance***.

L'antigène portant généralement plusieurs déterminants antigéniques, la conséquence sera souvent la formation d'un complexe qui précipite. Ceci est particulièrement visible dans les expériences d'immunologie effectuées *in vitro* où l'on voit apparaître des arcs de précipitation lors de la formation des complexes immuns. Dans l'organisme cela favorise probablement la formation d'agrégats qui sont facilement reconnus par les cellules tueuses.

- **Immobilisation de l'antigène par l'anticorps et destruction du complexe**

C'est là que résident les principales différences avec le fonctionnement des enzymes. À partir du moment où l'interaction antigène-anticorps est établie, aucune activité de type catalytique n'intervient. L'antigène est donc immobilisé et le complexe immun ne se dissocie pas. Grâce à la fonction effectrice de la région Fc de l'anticorps, les complexes immuns interagissent avec d'autres éléments du système immunitaire (macrophages, cellules tueuses, protéines du complément). Une cascade d'événements conduit à la destruction du complexe immun entier. Contrairement aux enzymes qui sont inchangées après dissociation du complexe enzyme-substrat, ***les anticorps sont donc détruits avec l'antigène qu'ils ont ciblé***.

C. Applications. Utilisation des anticorps en immunocytochimie

La spécificité des anticorps en fait des *outils très puissants* à la disposition des biologistes. Pour les biochimistes ils servent à identifier

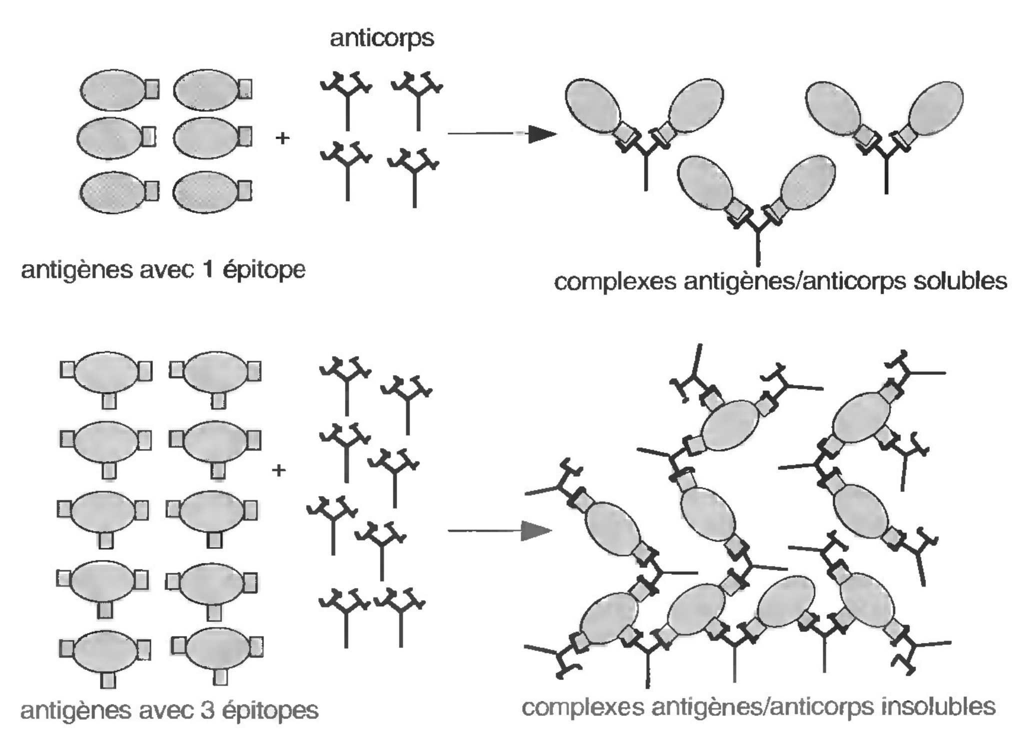


Fig. III-76 : Formation des complexes immuns solubles et insolubles.
(D'après W.M. BECKER, 1986.)

des macromolécules après fractionnement sur gel. Les anticorps peuvent aussi être couplés à une matrice dans une colonne d'affinité (voir p. 67) et permettre ainsi une séparation et une purification de certaines macromolécules. Pour les immunocytochimistes, *les anticorps servent de sonde* pour détecter spécifiquement en place dans la cellule les antigènes recherchés. C'est ce dernier aspect que nous allons rapidement illustrer.

Des anticorps sont préparés par injection à une espèce animale (lapin, mouton, chèvre, cobaye...) d'un antigène X purifié. Le sérum recueilli contient de nombreux anticorps parmi lesquels les anticorps anti-X (on parle de ***sérum polyclonal***). Par des méthodes biochimiques, le sérum est purifié de façon à séparer les anticorps anti-X des autres anticorps présents. Depuis une quinzaine d'années on sait préparer des ***anticorps monoclonaux***, capables théoriquement de se fixer spécifiquement sur un seul épitope. Le principe est établi sur la fusion de lymphocytes B (sécréteurs d'anticorps) et de cellules de myélomes, de façon à obtenir des hybridomes capables de synthétiser des anticorps et ayant, comme les cellules cancéreuses dites « immortelles », une croissance illimitée (contrairement aux lymphocytes B que l'on ne peut conserver en culture).

Quel que soit le mode d'obtention des anticorps – monoclonaux ou polyclonaux – ils peuvent ensuite être utilisés pour rechercher la présence éventuelle et repérer la localisation d'un antigène sur une coupe fine (1 µm pour la microscopie optique) ou ultrafine (60 à 90 nm pour la microscopie électronique).

Le principe est présenté sur la *figure III-77, A.*

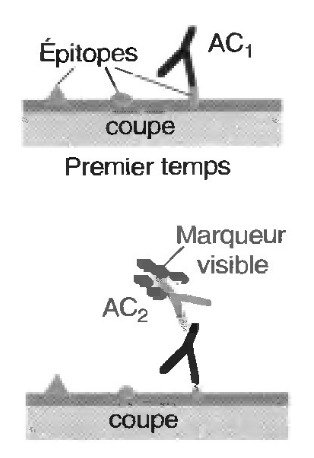


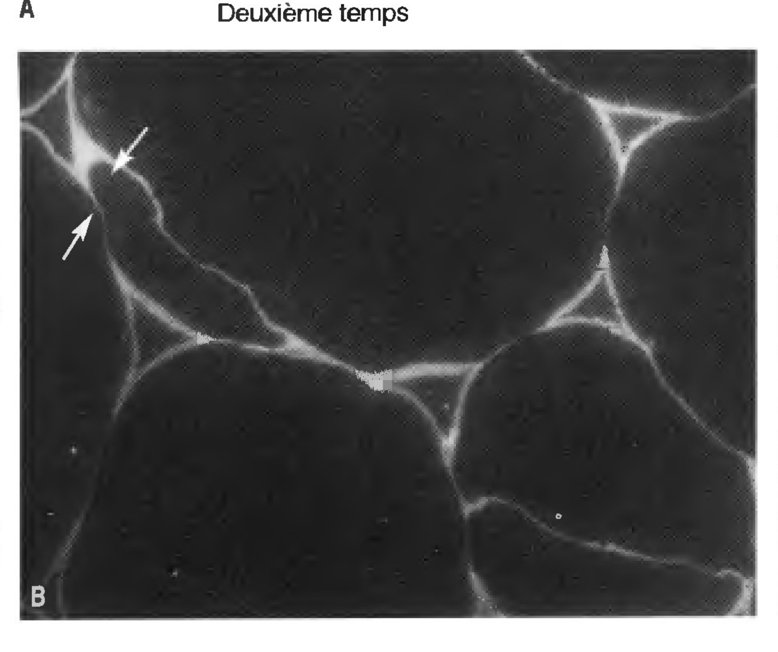
Fig. III-77 : Immunocytochimie : utilisation de l'outil anticorps en biologie cellulaire.

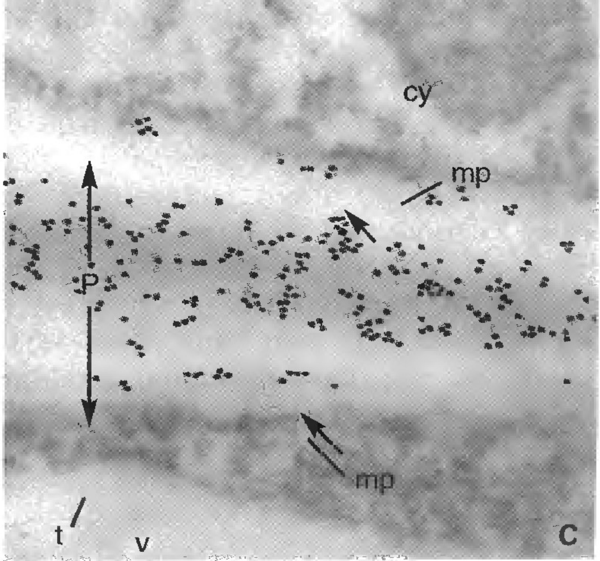
A) Principe de la technique (ici technique en deux temps).

B) Détection par immunofluorescence de polygalacturonanes (composé pectique) dans les parois végétales. La fluorescence est très importante autour des méats intercellulaires (flèches) où les pectines sont concentrées. En revanche, certaines régions pariétales sont très peu marquées.

C) Immunomarquage à l'or colloïdal (particules d'or de 15 nm) du même antigène. Observation au microscope électronique. Le marquage est surtout visible dans la région médiane de la paroi P (localisée entre les deux grandes flèches) et le long de la membrane plasmique, mp (petites flèches) ; cy, cytoplasme ; t, tonoplaste ; v, vacuole.

(Clichés B. VIAN.)





Il s'agit d'une *méthode indirecte en deux temps,* méthode la plus habituellement utilisée :

– dans un premier temps, l'anticorps spécifique AC_1 est fixé sur la coupe et s'attache sur l'épitope contre lequel il est dirigé ;

– dans un deuxième temps un sérum contenant des anticorps dirigés contre les IgG de l'espèce animale chez laquelle ont été synthétisés les AC_1 est utilisé. Les anticorps de ce sérum sont couplés à un *marqueur visible*. Plusieurs types de marqueurs existent parmi lesquels les plus utilisés sont : a) les marqueurs fluorescents pour la microscopie optique (observables en lumière ultra-violette) ; b) les marqueurs enzymatiques utilisables en microscopie optique et électronique ; c) les marqueurs métalliques opaques aux électrons pour la microscopie électronique. Actuellement l'or colloïdal est un des marqueurs les plus utilisés ; la taille de ses particules peut facilement être calibrée (de 5 nm à 100 nm).

Les *figures III-77, B et C* illustrent, à titre d'exemple, le résultat de tels *immunomarquages* en vue de détecter sur des coupes de cellules végétales des composés de paroi riches en acide polygalacturonique. Bien entendu, pour toute détection des témoins doivent être effectués (anticorps pré-adsorbés avant le marquage sur l'antigène contre lequel il est dirigé, marquage avec un sérum non immun) pour contrôler les risques possibles de marquage aspécifique.

CHAPITRE IV

Les lipides

Ces constituants biologiques essentiels, très hétérogènes, représentent 10 à 15 % du poids sec de la matière vivante. Ce sont des composés ternaires (C, H, O) difficiles à définir. Leurs seuls caractères communs sont des propriétés physiques : insolubles dans l'eau, car ils contiennent de très nombreux groupements hydrophobes, ils sont solubles dans les solvants organiques, l'éther-alcool, le chloroforme, l'acétone... Ils peuvent être extraits des cellules par les solvants apolaires.

Au point de vue chimique, ce sont des substances qui contiennent, dans leur molécule, des acides gras.

1. LES ACIDES GRAS

1.1. CARACTÈRES GÉNÉRAUX

Ces composés sont en grande partie responsables des propriétés des lipides. L'acide gras le plus simple est l'acide butyrique ($C_4H_8O_2$) dont la formule peut être présentée ainsi :

```
      CH2          COOH
      / \         /
  CH3    CH2
 |____________| |__________|
Chaîne carbonée  Fonction acide
```

La chaîne carbonée est constituée par des groupements apolaires, elle est très fortement **hydrophobe.**

Le groupement carboxyle (la fonction acide) est par contre très hydrophile.

1.2. LES DIFFÉRENTS ACIDES GRAS

Les acides gras sont tous des *mono-acides* qui se différencient par la longueur de leur chaîne. Celle-ci comporte toujours **un nombre pair d'atomes de carbone**. Ce nombre, n, est plus ou moins important ; lorsqu'il est supérieur à 10, les acides gras sont insolubles dans l'eau. La dualité de la molécule lui confère alors des propriétés particulières ; comme toutes les molécules bipolaires, les acides gras en présence d'eau vont en effet avoir tendance à s'associer en ensembles orientés. Ce sont, soit des *films,* soit des *micelles (fig. IV-1)* :

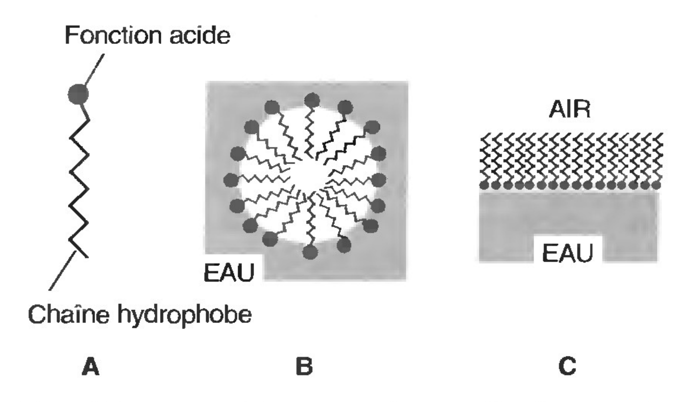


Fig. IV-1 : Les acides gras, des molécules amphiphiles.
A) Schématisation de la molécule d'acide gras montrant l'importance et la position de la longue chaîne hydrophobe par rapport à la fonction acide, hydrophile représenté en rouge.
B) En milieu aqueux, organisation micellaire des acides gras.
C) À l'interface air-eau, constitution d'un film monomoléculaire orienté où seules les fonctions acides sont en contact avec l'eau.

La numérotation des carbones des acides gras débute toujours par la fonction acide.

```
8       6       4       2
CH3     CH2     CH2     CH2
   \   /   \   /   \   /   \
    CH2     CH2     CH2     COOH
    7       5       3       1
```

On peut également désigner les carbones par des lettres grecques, mais alors la fonction acide est exclue.

```
                γ       α
CH3     CH2     CH2     CH2
   \   /   \   /   \   /   \
    CH2     CH2     CH2     COOH
            δ       β
```

On distingue deux types d'acides gras, selon qu'ils contiennent ou non des doubles liaisons : les *acides gras saturés* et les *acides gras insaturés*.

A. Les acides gras saturés

La formule globale est la suivante :

$$CH_3–(CH_2)_n–COOH$$

où n est compris entre 2 et 22. On a par exemple :

	Nombre de carbones	Point de fusion
Acide butyrique : $CH_3–(CH_2)_2–COOH$	4	– 8 °C
Acide palmitique : $CH_3–(CH_2)_{14}–COOH$	16	+ 63 °C
Acide stéarique : $CH_3–(CH_2)_{16}–COOH$ (avec lequel sont fabriquées les bougies)	18	+ 69 °C
Acide arachidique : $CH_3–(CH_2)_{18}–COOH$	20	+ 76 °C

Il apparaît donc que pour les acides gras saturés le point de fusion augmente avec le nombre des atomes de carbone constituant la molécule.

B. Les acides gras insaturés

Ils sont deux fois plus nombreux que les saturés. Dans ces acides gras, *il existe au moins une double liaison entre deux carbones* ; il en existe parfois plusieurs et ceci conditionne très largement les propriétés de la molécule. Voir par exemple les molécules les plus fréquentes dans le tableau ci-contre.

Il découle de ce tableau que, en ce qui concerne les acides gras insaturés, le point de fusion ***augmente avec le nombre d'atomes de carbone certes mais dépend également du nombre des doubles liaisons*** ; à nombre égal d'atomes de carbone, plus celles-ci sont nombreuses plus le point de fusion est abaissé. *Il faudra se souvenir de cette propriété lorsqu'on étudiera les lipides, surtout ceux qui jouent un rôle structural comme c'est le cas dans les membranes cellulaires.*

Une seconde constatation concerne la forme des molécules ; alors que celle des acides gras saturés est rectiligne, celle des insaturés change d'orientation au niveau des doubles liaisons *(fig. IV-2)*.

Enfin beaucoup d'acides gras polyinsaturés, c'est-à-dire possédant plusieurs doubles liaisons, ne sont pas synthétisés par l'homme et certains animaux ; *ce sont les acides gras*

	Nombre de carbones	Point de fusion
Acide palmitoléique $CH_3-(CH_2)_5-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$ 16 carbones mais une seule double liaison ce que l'on indique 16:1	16	+ 0,5 °C
Acide oléique $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$ une double liaison c'est donc un 18:1	18	14 °C
Acide linoléique $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$ deux doubles liaisons c'est donc un 18:2	18	– 5 °C
Acide linolénique $CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$ trois doubles liaisons c'est donc un 18:3	18	– 11 °C
Acide arachidonique $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=$ $CH-(CH_2)_3-COOH$ quatre doubles liaisons c'est donc un 20:4	20	– 49 °C

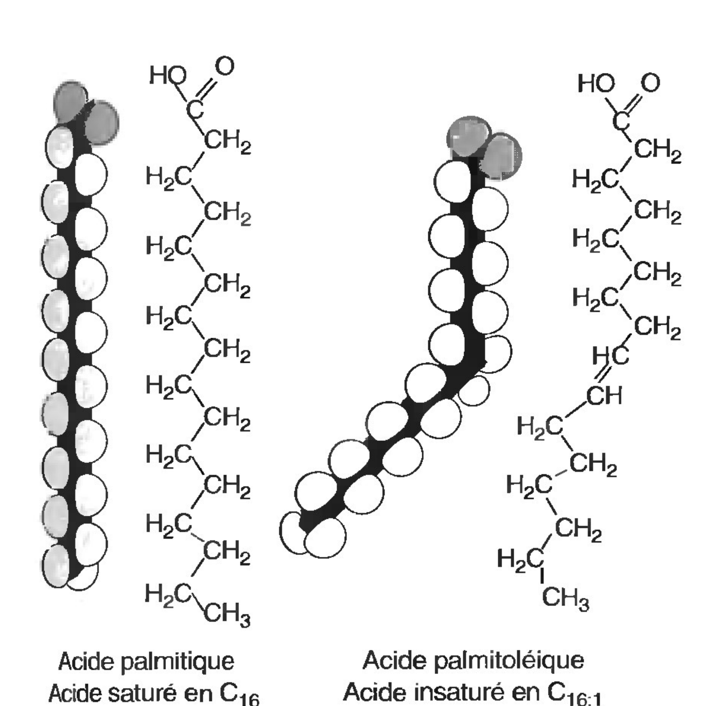


Fig. IV-2 : Acides gras saturés et insaturés : formules moléculaires et modèles moléculaires à boules.

indispensables ; le plus souvent d'origine végétale, ils doivent être apportés par l'alimentation.

1.3. ACIDES GRAS ET LIPIDES

Les acides gras entrent dans la constitution des lipides ; ils sont alors associés à un autre composant soit par une *liaison ester*, soit en formant *une amide*.

Ce ne sont donc pas les acides gras qui vont permettre de déterminer le type de lipide, mais le constituant avec lequel ils sont associés. On distingue ainsi les *glycérolipides* obtenus par estérification du glycérol, les *sphingolipides* qui sont des amides de la sphingosine, les *cérides*, esters d'alcools à très longue chaîne carbonée, les *stérides* résultant de l'estérification d'alcools polycycliques, les stérols. D'autres lipides, les lipides isopréniques, sont plus hétérogènes et particuliers.

2. LES GLYCÉROLIPIDES

2.1. LE GLYCÉROL ET L'ESTÉRIFICATION DES ACIDES GRAS

Le glycérol est un trialcool (ou triol) qui se présente comme un liquide sirupeux, à goût sucré ; sa formule est la suivante :

CH_2OH	Alcool primaire
$CHOH$	Alcool secondaire
CH_2OH	Alcool primaire

Il possède donc des groupements très réactifs, *il est très soluble dans l'eau* à laquelle il est miscible en toutes proportions.

Ce glycérol peut estérifier des acides gras. Rappelons qu'une estérification, ou formation d'un ester, est obtenue par combinaison d'un acide et d'un alcool :

$$\underset{\text{Alcool primaire}}{R{-}CH_2OH} + \underset{\text{Acide}}{HOOC{-}R'} \rightarrow \underset{\text{Ester}}{R{-}CH_2{-}O{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}R'} + \underset{\text{Eau}}{H_2O}$$

R et R' étant des radicaux différents.

Le glycérol possédant trois fonctions alcool, il y a trois possibilités d'estérifications. Si celles-ci sont effectuées par des acides gras, on pourra avoir des mono, des di ou des triglycérides *(fig. IV-3)*.

$CH_2{-}O{-}CO{\sim}$ / $CHOH$ / CH_2OH — Monoglycéride

$CH_2{-}O{-}CO{\sim}$ / $CH{-}O{-}CO{\sim}$ / CH_2OH — Diglycéride

$CH_2{-}O{-}CO{\sim}$ / $CH{-}O{-}CO{\sim}$ / $CH_2{-}O{-}CO{\sim}$ — Triglycéride

Fig. IV-3 : Représentation schématique des glycérides.

2.2. LES TRIGLYCÉRIDES

Les triglycérides ou ***triacylglycérols*** sont des constituants biologiquement importants car, *très énergétiques*, ils représentent *une forme de réserve essentielle*, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux.

On les trouve sous forme de gouttelettes dans toutes les cellules ; cependant, chez les animaux, certaines en accumulent en très grandes quantités, ce sont *les adipocytes*, formant le tissu adipeux ; chez les végétaux on les rencontre en grandes quantités dans certains fruits (olive, avocat) ou graines (graines oléagineuses : arachide, tournesol). Leur importance économique est donc considérable.

A. Constitution

Étant donné qu'il y a trois fonctions alcool estérifiées et une grande variété d'acides gras, les glycérides sont très diversifiés.

On peut ainsi distinguer *les glycérides homogènes*, où les trois fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par le même acide gras, comme la tristéarine (glycérol et 3 acides stéariques) ou la trioléine (glycérol et 3 acides oléiques), et *les glycérides hétérogènes* ou mixtes.

$CH_2{-}O{-}CO{-}C_{17}H_{33}$	$CH_2{-}O{-}CO{-}C_{17}H_{33}$
$CH{-}O{-}CO{-}C_{17}H_{33}$	$CH{-}O{-}CO{-}C_{17}H_{35}$
$CH_2{-}O{-}CO{-}C_{17}H_{33}$	$CH_2{-}O{-}CO{-}C_{17}H_{33}$
Trioléine	*Glycéride hétérogène*

B. Propriétés physiques

Cette variété de constitution influe sur les propriétés physiques des glycérides naturels ; ceux-ci ne sont que très rarement constitués par un seul type de glycéride homogène. Ce sont en effet des mélanges de glycérides homogènes et hétérogènes, différant par leur constitution en acides gras ; étant donné que le point de fusion de ces derniers dépend à la fois du nombre des carbones et de celui des doubles liaisons, l'état physique des glycérides naturels sera très varié ; *il dépendra notamment de la proportion relative des acides saturés et insaturés.* On distingue : *les huiles*, liquides à 15 °C, riches en acides gras insaturés ; *les beurres*, dont le point de fusion se situe autour de 25 °C, où les acides gras saturés à petit nombre d'atomes de carbone sont abondants ; *les graisses*, fondant entre 35 et 40 °C, formées par un mélange d'acides gras saturés et insaturés à 16 et 18 carbones ; *les suifs*, dont le point de fusion est supérieur à 40 °C où la tristéarine est abondante.

Dans les glycérides, les groupements hydrophiles du glycérol et celui des acides gras sont engagés dans la liaison ester ; seuls les groupements hydrophobes sont libres ; il s'ensuit que ***la molécule est fortement insoluble dans l'eau***, c'est pourquoi dans la cellule les glycérides sont sous forme de gouttelettes intracytoplasmiques ; le contour de celles-ci est net car il correspond à une séparation de phases ; elles ne sont pas limitées par une membrane.

C. Propriétés chimiques

Les glycérides sont des esters et sont donc hydrolysables en leurs constituants, glycérol et acides gras. Dans les organismes, ce sont des enzymes, les *lipases*, qui permettent cette hydrolyse.

En milieu alcalin et à chaud, il y a saponification.

$CH_2\text{–}O\text{–}CO\text{–}R_1$		CH_2OH	$R_1\text{–}COONa$
$CH\text{–}O\text{–}CO\text{–}R_2$	$+ 3\ NaOH \rightarrow$	$CHOH$	$+\ R_2\text{–}COONa$
$CH_2\text{–}O\text{–}CO\text{–}R_3$		CH_2OH	$R_3\text{–}COONa$
Triglycéride	*Soude*	*Glycérol*	*Savons*

Les propriétés de ces savons sont dues à leur polarité. Par leur chaîne hydrophobe, ils peuvent s'insérer dans les corps gras, par leur radical COONa hydrophile, ils peuvent se lier à l'eau ; ils permettent donc *la dispersion des corps gras en milieu aqueux.*

2.3. LES PHOSPHO-GLYCÉROLIPIDES

Ce sont des molécules plus complexes que les glycérides. En effet, dans ces constituants cellulaires extrêmement importants, seules deux fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par des acides gras, la troisième l'étant par un acide phosphorique *(fig. IV-4).*

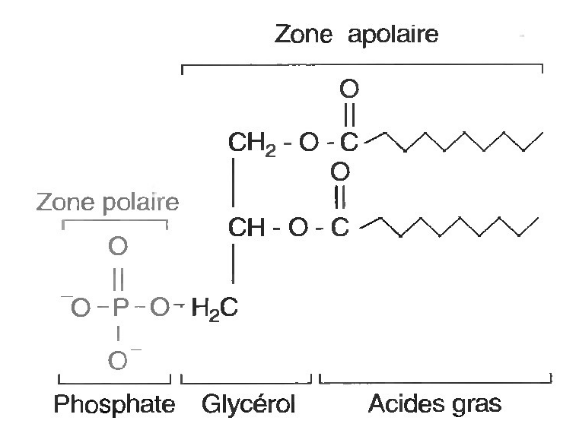


Fig. IV-4 : Un phosphatidate.

Cette molécule est un *phosphatidate* ; elle possède une extrémité apolaire (celle correspondant aux acides gras) et une autre polaire, *ionisée au pH cellulaire* (l'acide phosphorique) ; c'est une **molécule amphiphile** qui au contact de l'eau adoptera une position comparable à celle des acides gras, c'est-à-dire qu'elle sera susceptible de former des micelles ou des couches monomoléculaires *(fig. IV-5).* On appelle **lipides polaires** l'ensemble des lipides possédant cette propriété.

Dans ce phosphatidate, deux fonctions acides ne sont pas estérifiées. L'une de celle-ci peut être estérifiée par un amino-alcool ; la nouvelle molécule ainsi constituée est un ***phosphoaminolipide* (PLP).**

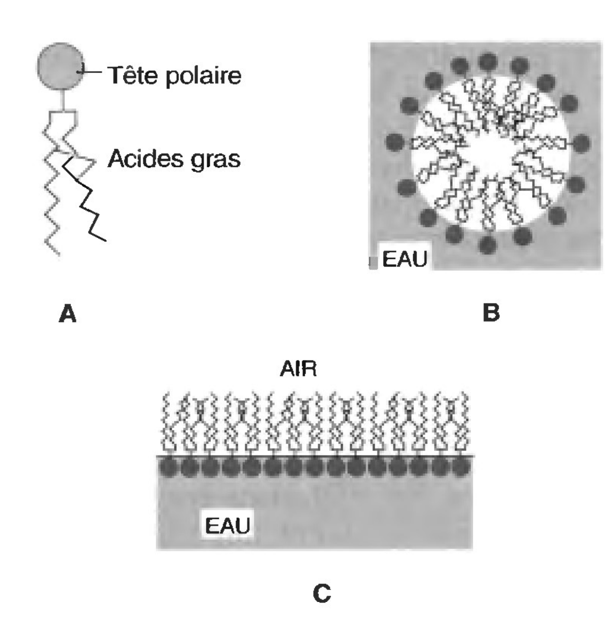


Fig. IV-5 : Lipides polaires et environnement aqueux.
A) Représentation schématique d'un lipide polaire.
B) Formation d'une micelle en milieu aqueux.
C) Étalement en couche monomoléculaire à l'interface air-eau.

L'amino-alcool peut être :

la sérine $CH_2OH{-}CH(NH_2){-}COOH$

(et le phosphoaminolipide formé est la *phosphatidylsérine*)

ou l'éthanolamine $CH_2OH{-}CH_2{-}NH_2$ (c'est alors la *phosphatidyléthanolamine*).

Les phosphatidylsérines et les phosphatidyléthanolamines forment ce que l'on nomme les céphalines.

L'amino-alcool peut aussi être la *choline* :

$$(CH_3)_3{-}^{+}N{-}CH_2{-}CH_2OH$$

on a alors les *phosphatidylcholines* ou lécithines *(fig. IV-6)*.

Ce sont donc des molécules *amphiphiles* possédant une extrémité hydrophile, généralement chargée, et une extrémité hydrophobe qui, au contact de l'eau, vont, comme les phosphatidates, former des structures orientées *(fig. IV-5)*, micellaires et surtout feuilletées (lipides polaires). Ces associations en couches sont des *autoassemblages* ; elles sont dues à la bipolarité de la molécule et joueront un rôle considérable dans la formation des membranes biologiques.

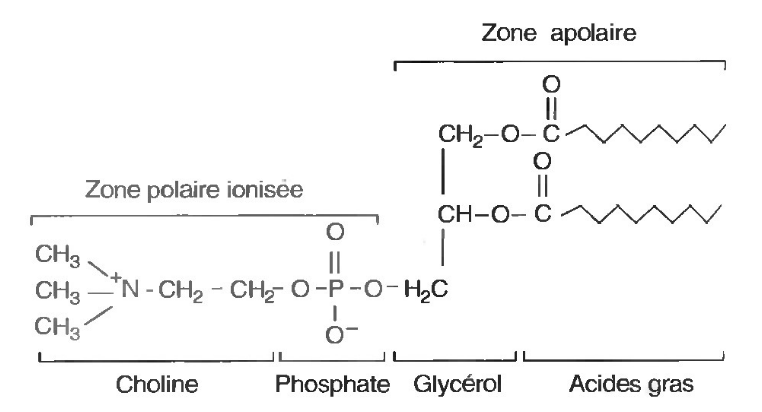


Fig. IV-6 : La phosphatidylcholine, un phospholipide présent dans de nombreuses membranes biologiques.

3. LES SPHINGOSIDES

Ce sont des lipides polaires dont l'organisation est fort comparable à celle des phosphoaminolipides, mais le glycérol est remplacé par la sphingosine *(fig. IV-7)* qui possède une longue chaîne hydrophobe. L'acide gras est uni à ce composé non pas par une liaison ester mais par une liaison amide. On a donc constitution d'un lipide complexe *(fig. IV-8)*.

Ce sont également des *molécules amphiphiles* (lipides polaires) qui joueront un rôle important dans la constitution des structures membranaires, notamment dans la formation

```
                 Alcool
                   ↓
              OH
              |
         H    CH2
Tête     |    |
polaire  HO—C—C—H
         |    |
         CH   NH2  ← Amine
         |
         HC
         |
         CH2
         |
         CH2
         |
         CH2
         |
         CH2
         |
         CH2
         |
         CH2         Chaîne
         |           hydrophobe
         CH2
         |
         CH2
         |
         CH2
         |
         CH2
         |
         CH2
         |
         CH2
         |
         CH3
```

Fig. IV-7 : La sphingosine.
Molécule à longue chaîne carbonée hydrophobe et à tête polaire hydrophile. Deux fonctions, une amine et une alcool, vont permettre la liaison d'un acide gras (liaison amide) et d'un acide phosphorique (liaison ester), donnant naissance à un lipide polaire complexe, un sphingoside.

de la *gaine de myéline* autour de l'axone des neurones.

Dans certaines molécules, l'amino-alcool-phosphate, c'est-à-dire la région polaire de la molécule, est remplacé par une molécule d'ose, galactose le plus souvent ; celle-ci est également polaire ; ce sont donc toujours des molécules amphiphiles qui interviendront également dans la constitution de certaines membranes.

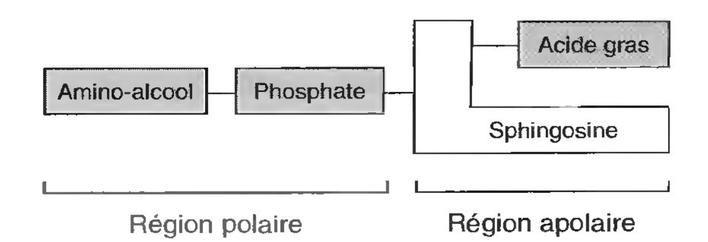


Fig. IV-8 : Représentation schématique d'un sphingoside.

4. LES CÉRIDES

Ce sont des esters d'acides gras et de monoalcools à longue chaîne hydrophobe (*fig. IV-9*).

Par exemple, le résultat de l'estérification de l'alcool myricylique $C_{29}H_{59}–CH_2OH$ par l'acide palmitique $C_{15}H_{31}–COOH$ est la cire d'abeille.

Ce sont toujours de longues chaînes très hydrophobes qui, associées latéralement, forment des revêtements imperméables comme ceux qui recouvrent les feuilles ou fruits de certains végétaux et leur donnent un aspect brillant (pomme, feuille de choux par exemple).

Ce sont des lipides très résistants qui jouent un rôle essentiellement protecteur ; outre les revêtements végétaux ils forment, par exemple, la couverture des poils, des plumes...

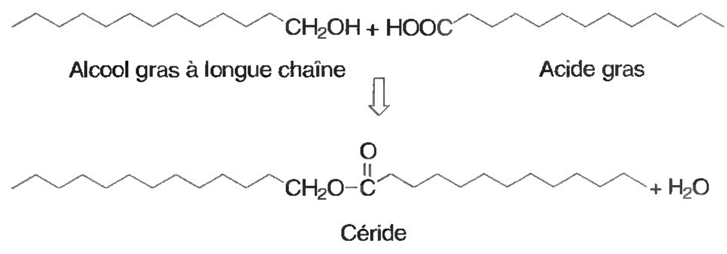


Fig. IV-9 : Formation d'un céride.

5. LES STÉRIDES

Les stérides sont des lipides obtenus par estérification d'un *acide gras* et d'un *stérol*.

Les stérols sont des *alcools polycycliques*; ils diffèrent les uns des autres par la nature et la position des groupements portés par le noyau, le stérane.

On distingue, par leur origine biologique, les zoostérols d'origine animale parmi lesquels le plus connu est le *cholestérol* *(fig. IV-10)*, et les phytostérols d'origine végétale. Les Procaryotes en sont pratiquement dépourvus.

Ils présentent un pôle hydrophile, une fonction alcool, qui peut être estérifiée par un acide gras, et une grande partie hydrophobe, cyclique et plane. Ces stérols sont biologiquement très importants à double titre : d'une part, ce sont des *constituants des membranes plasmiques* et, d'autre part, certains de leurs dérivés sont des *hormones essentielles* *(fig. IV-11)* : androstérone, testostérone, œstradiol, cortisone...

Fig. IV-10 : Stérols et stérides.
A) Un exemple de zoostérol, le cholestérol. La flèche indique la fonction alcool estérifiable.
B) Stéride, résultat de l'estérification du cholestérol par un acide gras.

Fig. IV-11 : Dérivés de stérols.
A) Cortisone. B) Progestérone.

6. LES LIPIDES ISOPRÉNIQUES

Les caroténoïdes sont des composés d'origine végétale, possédant de nombreuses doubles liaisons conjuguées susceptibles d'*absorber certaines radiations lumineuses*, d'où leurs couleurs intenses.

On distingue *(fig. IV-12)*:

– Les carotènes qui sont des carbures d'hydrogène, $C_{40}H_{56}$ comme le lycopène, donnant sa couleur rouge à la tomate, le β carotène de couleur orangée, abondant dans la carotte.

– Les xanthophylles qui diffèrent des carotènes car ils contiennent un nombre plus ou moins grand de groupements oxygénés, ce qui leur confère des couleurs très variées, crocétine du safran, violaxanthine de la violette.

On range à côté de ces molécules pigmentaires un certain nombre d'autres jouant un rôle biologique non négligeable comme par exemple la vitamine A.

Lycopène

β-carotène

Violaxanthine

Fig. IV-12 : Quelques exemples de lipides isopréniques.

En conclusion, les lipides sont des substances extrêmement variées qui jouent à la fois un rôle structural comme constituants des membranes biologiques (lipides polaires c'est-à-dire phosphoaminolipides, sphingosides, stérides) et un rôle énergétique (triglycérides) formant alors une part importante des réserves de l'organisme, qu'il soit animal ou végétal.

CHAPITRE V

Les glucides

Les glucides sont des molécules organiques très largement répandues dans les principaux types cellulaires décrits : bactéries, cellules animales, cellules végétales. Ce sont les composés formés au cours de la photosynthèse. Ils sont donc très importants dans le monde biologique. Leur analyse élémentaire donne C, H, O (avec parfois N et S). Pendant longtemps leur formule brute a été écrite sous la forme $C_n(H_2O)_n$, ce qui explique leur nom d'hydrates de carbone. En fait la formule générale est :

$$(CH_2O)\ n,\ \text{où}\ n = 3, 4, 5, 6\ \text{ou}\ 7$$

et le terme *glucide* (du grec *glukus*, doux, en raison de la saveur sucrée des glucides) est le plus généralement retenu.

L'importance biologique des glucides est considérable à plusieurs niveaux. Sur le plan de la *biomasse*, par exemple, puisque plus de la moitié du carbone de la biosphère est mobilisée sous la forme d'un glucide, la cellulose. C'est le matériau de renfort de la paroi des cellules végétales dans laquelle il participe à la structure tridimensionnelle et joue un rôle de *soutien*. D'autres polymères glucidiques jouent un rôle de *réserve* : c'est le cas de l'amidon des cellules végétales et du glycogène des cellules animales. Leur dégradation permet la récupération d'énergie sous forme d'ATP. D'autres glucides sont impliqués dans les phénomènes de *reconnaissance cellulaire* : il s'agit alors de séquences glucidiques courtes qui sont de véritables signaux pour les cellules.

Les glucides sont très *variables* en ce qui concerne la taille des molécules. On rencontre de petites molécules libres, très solubles, dont le glucose est l'exemple type. On rencontre aussi des polymères de masse moléculaire très élevée, très résistants aux tensions, telles la cellulose et la chitine. Entre ces deux extrêmes toutes les tailles moléculaires existent.

1. LES MONOSACCHARIDES OU SUCRES SIMPLES

Ce sont les monomères des glucides, souvent appelés les **oses**. Il s'agit de composés non ramifiés comportant un nombre d'atomes de carbone variant entre 3 et 7 et dont l'appellation dépend de ce nombre :

3C trioses
4C tétroses
5C pentoses
6C hexoses
7C heptoses.

Pour le biologiste les pentoses et les hexoses représentent les composés les plus importants dans la mesure où ils sont les plus couramment rencontrés.

Les caractéristiques générales des oses sont les suivantes :

- **La présence sur un carbone** :
  - Soit d'une fonction **aldéhyde** O=C–H (–C(=O)–H). Il s'agit alors d'un **aldose**.
  - Soit d'une fonction **cétone** –C=O. Il s'agit alors d'un **cétose**.
- **La présence sur les autres carbones** :
  - Soit d'une fonction **alcool primaire** $-CH_2OH$.
  - Soit d'une fonction **alcool secondaire** –CHOH.

1.1. LES ALDOSES

A. *Description d'un exemple : le glycéraldéhyde*

C'est le plus simple des aldoses. Il comporte 3C : c'est donc un *aldotriose (fig. V-1).*

La numérotation des carbones se fait à partir de l'extrémité la plus proche de l'aldéhyde. La molécule est représentée ici de *façon linéaire*, la fonction aldéhyde étant vers le haut et la fonction alcool primaire étant vers le bas : il s'agit d'une projection de Fischer.

(1) C(=O)—H	*Aldéhyde*
H—(2) C—OH	*Alcool secondaire*
(3) CH_2 OH	*Alcool primaire*

Fig. V-1 : Formule du glycéraldéhyde.

B. *Stéréoisomérie*

Le glycéraldéhyde comporte un carbone asymétrique, le C_2, qui porte quatre substitutions différentes. En conséquence les deux fonctions H et OH peuvent adopter deux orientations différentes *(fig. V-2).*

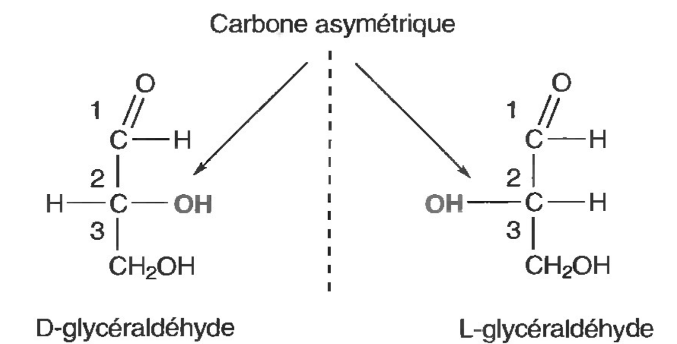


Fig. V-2 : Stéréoisomérie.
D-glycéraldéhyde et L-glycéraldéhyde, les deux énantiomères du glycéraldéhyde.

Le glycéraldéhyde est donc une molécule chirale (voir p. 34) et existe sous deux formes symétriques par rapport à un plan (ou l'image l'une de l'autre par rapport à un miroir). Par définition le composé dont le groupe OH est orienté à gauche est le L-glycéraldéhyde, tandis que le composé dont le groupe OH est orienté vers la droite est le D-glycéraldéhyde. Ces deux formes sont des *énantiomères* (du grec *enantios*, opposé). Plus généralement on les appelle des *stéréoisomères* puisque seule leur géométrie est différente. Leurs propriétés physiques et chimiques sont les mêmes, seuls leurs pouvoirs rotatoires sont opposés : dextrogyre (+) lorsque la lumière polarisée est déviée vers la droite, lévogyre (–) lorsque la lumière polarisée est déviée vers la gauche.

C *Filiation des aldoses*

Par voie de synthèse chimique il est possible d'ajouter un carbone portant une fonction alcool secondaire. Dans cet homologue supérieur (ose à 1 carbone supplémentaire) les fonctions OH de l'alcool secondaire peuvent là encore adopter deux orientations différentes. Il existe donc deux stéréoisomères pour les tétroses dérivés du D-glycéraldéhyde *(fig. V-3).*

Lorsque le nombre de carbones augmente il est clair qu'un nombre considérable d'isomères peut exister. Par voie de synthèse chimique on obtient 50 % de formes L et 50 % de formes D. Dans une cellule les proportions sont différentes et les oses naturels les plus importants appartiennent généralement à la série D. La *figure V-4* montre la série des monosaccharides

```
      O                          O
  1  //                      1  //
     C—H                        C—H
   2 |                ↙   ↘   2 |
 H—C—OH                   OH—C—H
   3 |                        3 |
 H—C—OH                    H—C—OH
   4 |                        4 |
     CH2OH                      CH2OH
```

Fig. V-3 : Tétroses dérivés du D-glycéraldéhyde (isomères).

naturels dérivés du glycéraldéhyde de la série D. Le C supplémentaire est intercalé entre le C portant la fonction aldéhyde et celui déterminant l'isomérie optique (l'avant-dernier C). Ainsi dans la série des hexoses on voit que le glucose et le galactose ne diffèrent que par la position d'un seul OH en C4 (flèches), dans la série des pentoses le ribose et l'arabinose ne diffèrent que par la position d'un seul OH en C_2 : ce sont des *épimères*.

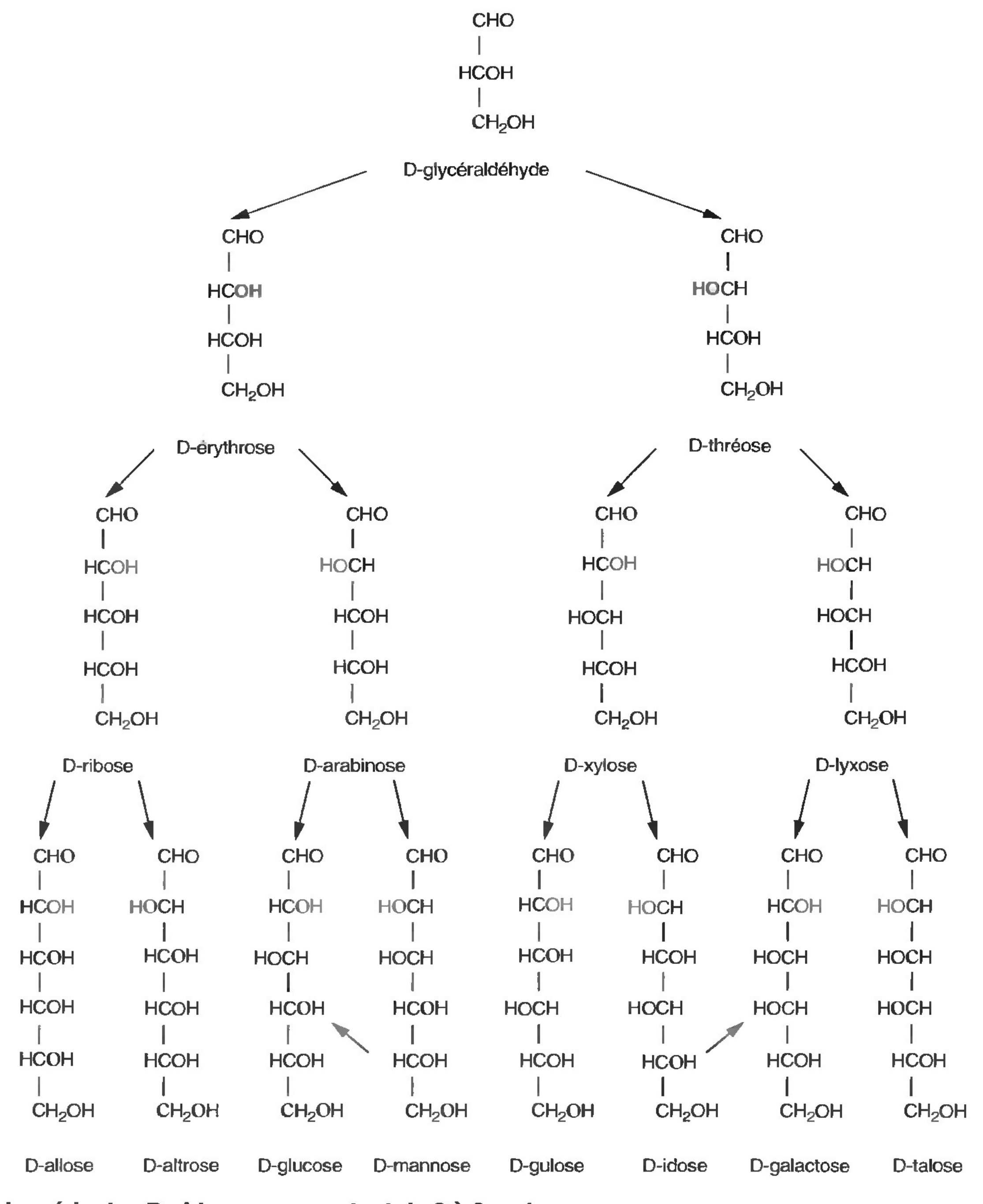


Fig. V-4 : La série des D-aldoses comportant de 3 à 6 carbones.

D Cyclisation des oses

Elle est due à la réaction du groupement aldéhyde ou cétone des monosaccharides et d'un alcool ; elle intervient pour des composés comportant au moins 4 carbones. Elle conduit à la formation d'un hémiacétal. La réaction fait intervenir par exemple le radical aldéhyde de C_1 et le radical –OH de C_4 ou de C_5 :

$$-\overset{H}{\overset{|}{C_1}}=O \quad + \quad HO-\overset{H}{\underset{H}{C_4}} \quad \rightarrow \quad \overset{H}{\underset{OH}{C}}-O-\overset{H}{C}-$$

Il se produit une véritable réorganisation de la molécule avec établissement d'un *pont oxydique*, disparition de la fonction aldéhyde ou cétone, fermeture du cycle osidique et formation d'un cycle hémiacétal.

Une autre représentation graphique des monosaccharides a été proposée à partir d'études aux rayons X. Il s'agit de la *représentation de Haworth*, une représentation en perspective où les oses apparaissent sous forme cyclique. Les hexoses ont un cycle hexagonal (*forme pyranose*) et les pentoses un cycle pentagonal (*forme furanose*). Dans cette représentation le groupe CH_2OH des hexoses et des pentoses se trouve au-dessus du plan du cycle dans la série D et au-dessous du plan dans la série L *(fig. V-5)*.

Une telle cyclisation fait apparaître un nouveau carbone asymétrique, le carbone C_1. Une autre isomérie est donc possible selon que le groupement OH porté par C_1 se trouve au dessus ou au-dessous du plan du cycle osidique : les formes qui en résultent sont appelées respectivement forme β et forme α. Ces deux formes sont des *anomères (fig. V-5)*.

Fig. V-5 : Formes α et β du glucose en représentation de Haworth.

E. Configuration spatiale

La représentation des monosaccharides reste imparfaite, même lorsqu'elle est sous la forme cyclique de Haworth ; les cycles sont en effet représentés sous forme plane, ce qui est trompeur. À cause des angles de valence et pour éliminer les forces de tension intramoléculaires, la molécule adopte en effet une configuration spatiale, la plus stable possible. Dans cette configuration, chaque atome de carbone du cycle est au centre d'un tétraèdre.

Deux formes sont possibles, la forme *chaise* et la forme *bateau,* dans lesquelles les substitutions extracycliques sont localisées soit dans un plan équatorial soit dans un plan axial *(fig. V-6)*. La stabilité maximale implique que les groupements extracycliques soient répartis le mieux possible dans l'espace, de façon à éviter les interactions. La *figure V-6, C* montre la configuration chaise adoptée par l'α-D-glucose.

F. Quelques aldoses importants en biologie

Le *ribose* est un pentose dont l'importance est considérable dans la construction de l'ARN, de nucléotides et de nucléosides (voir chap. VI). Le ribose entre aussi dans la constitution de nombreux co-enzymes (voir chap. VIII, 2e partie). La formule de la *figure V-7* représente le β-D-ribose (forme D car le C_5 est au-dessus du cycle, forme β car le groupement OH porté par C_1 est vers le haut).

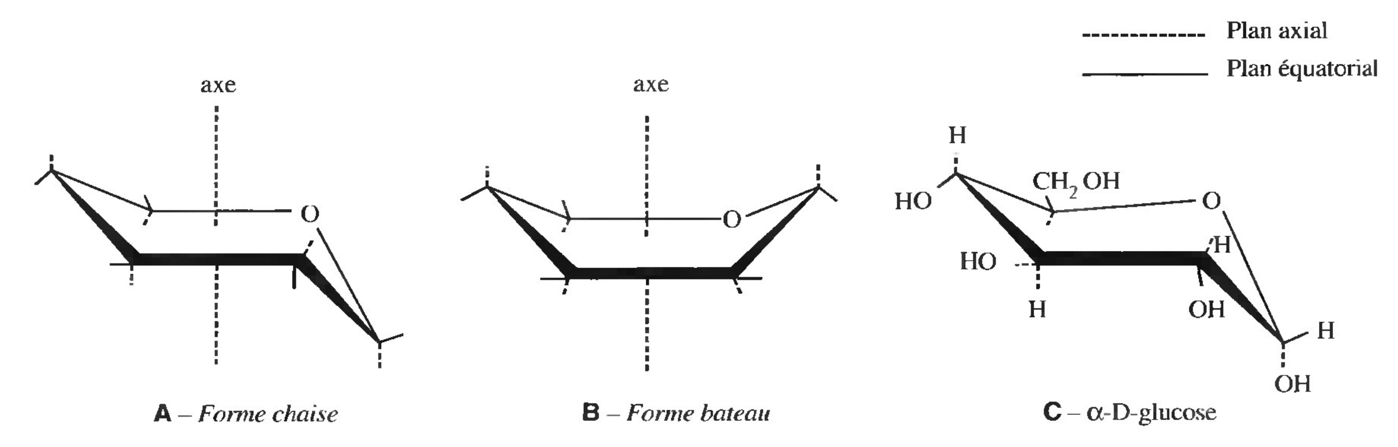


Fig. V-6 : Configuration chaise (A) et bateau (B) des hexoses.
Exemple de la configuration chaise de l'α-D-glucose (C).

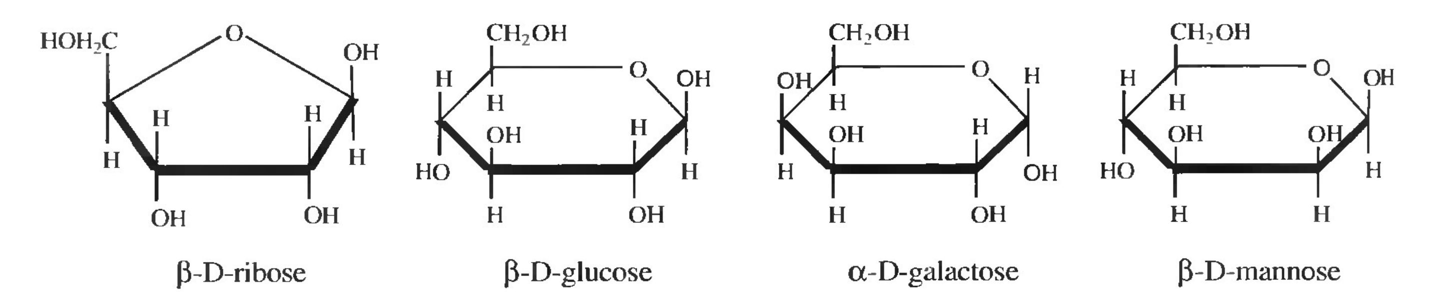


Fig. V-7 : Quelques aldoses couramment rencontrés en biologie.

Le *glucose* est l'hexose le plus répandu soit sous forme libre, soit sous forme combinée. Comme il sera vu un peu plus loin le glucose est le monomère de l'amidon, du glycogène et de la cellulose. Sa formule brute est $C_6H_{12}O_6$ et la forme la plus stable est le β-D-glucopyranose *(fig. V-7)*.

Le *galactose* et le *mannose* sont deux autres hexoses importants ; ils sont le plus souvent sous forme combinée. Le D-galactose et le D-mannose ne diffèrent du D-glucose que par la position du groupement OH porté respectivement par le C_4 et le C_2.

1.2. LES CÉTOSES

Les cétoses sont les oses portant une fonction cétone. Le plus simple des cétoses est le dihydroxyacétone. Il comporte 3 carbones *(fig. V-8)*. *Le dihydroxyacétone et le glycéraldéhyde ont la même formule brute et sont facilement interconvertibles.*

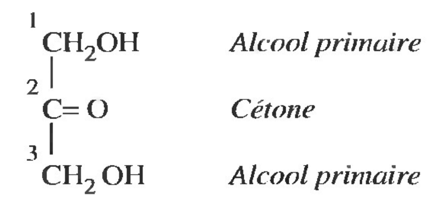


Fig. V-8 : Formule du dihydroxyacétone.

Parmi les cétoses, le *fructose* est un cétohexose important *(fig. V-9)*. C'est le sucre des fruits dans lesquels il est souvent à l'état libre. Il est présent en grande quantité dans les miels, en particulier dans les miels d'acacia. Le fructose est plus hydrosoluble que le glucose ce qui explique que ces miels restent liquides contrairement à d'autres miels plus riches en glucose qui cristallisent.

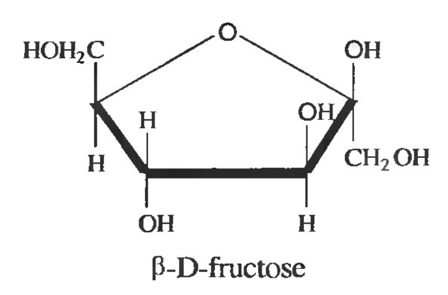


Fig. V-9 : Formule cyclique du β-D-fructose.

1.3. LES DÉRIVÉS DES ALDOSES ET DES CÉTOSES

De nombreux glucides ont des structures très voisines des oses dont ils dérivent par différentes réactions chimiques :

– *perte d'un oxygène*. C'est le cas du *désoxy-D-ribose*, pentose constitutif de l'ADN, dans lequel un hydroxyle porté par C_2 est remplacé par un atome d'hydrogène. C'est le cas aussi du *fucose* (6-désoxy-L-galactose) seul sucre de la série L en biologie, qui porte un groupement CH_3 à la place de CH_2OH sur le C_6 *(fig. V-10)*. Le fucose est un motif important dans les séquences d'oligosaccharides (voir plus loin).

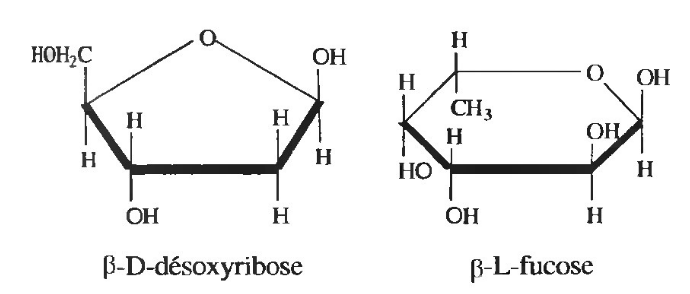


Fig. V-10 : β-D-désoxyribose et β-L-fucose.

– *oxydation de l'alcool primaire en acide*. C'est le cas des acides uroniques, acide D-glucuronique, acide D-galacturonique par exemple, importants en raison des charges qu'ils portent dues à l'ionisation des fonctions carboxyliques libres *(fig. V-11)*.

– *remplacement d'une fonction hydroxyle par un radical aminé* $-NH_2$. La *glucosamine* et la *galactosamine* sont les hexosamines les plus fréquentes dans le monde biologique. Souvent le groupement $-NH_2$ est lui-même acétylé devenant un groupement acétamide $-NH-CO-CH_3$. On obtient ainsi la N-acétylglucosamine ou la N-acétylgalactosamine *(fig. V-11)*, composés importants à la surface des cellules animales.

L'*acide N-acétylneuraminique* (souvent appelé acide sialique ou NANA) est aussi un dérivé d'ose important, entrant dans la composition des antennes glucidiques de molécules de la membrane plasmique et impliqué dans des mécanismes de reconnaissance cellulaire *(fig. V-12)*.

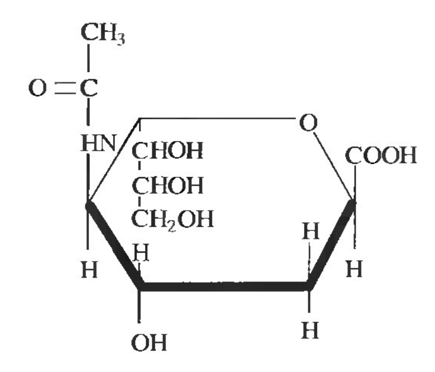
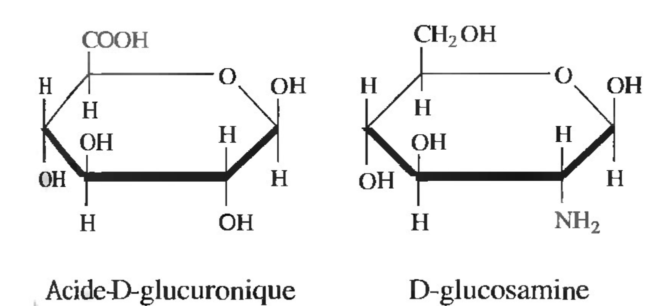
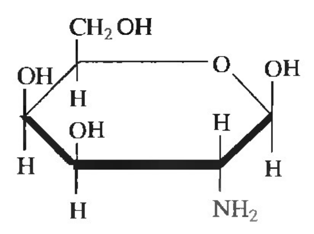


Fig. V-12 : L'acide N-acétylneuraminique (NANA), constituant important des membranes plasmiques.





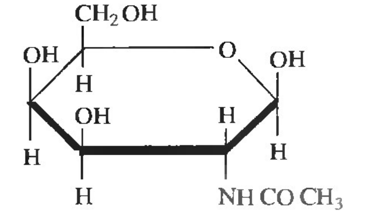


Fig. V-11 : Quelques dérivés des aldoses.

2. LES DISACCHARIDES

Les disaccharides résultent de la condensation de deux molécules d'oses ou de deux dérivés d'oses. Cet accrochage passe par la formation d'une *liaison covalente, la liaison glycosidique,* réaction du carbone 1 d'un ose avec un groupe OH d'un autre ose avec élimination d'une molécule d'eau *(fig. V-13)*.

Le *maltose* est l'exemple type d'un disaccharide, formé à partir de deux unités glucose, la liaison se formant entre l'OH en position α sur C_1 (porteur d'une fonction réductrice) et l'OH du C_4 de l'autre glucose. La liaison est donc une liaison de type α (1–4) et le diholoside obtenu est réducteur car il reste un groupement réducteur libre. Le maltose existe à l'état libre. Il est surtout important comme intermédiaire dans la mise en réserve du glucose chez les animaux sous forme de glycogène, et chez les végétaux sous forme d'amidon.

Le *lactose* est un autre disaccharide formé par une liaison β (1–4) entre le groupement réducteur du galactose et le C_4 du glucose. C'est le principal sucre du lait; c'est aussi le disaccharide utilisé par certaines souches bactériennes pour leur croissance.

Le *saccharose* (appelé sucrose par les Anglo-Saxons) est le disaccharide alimentaire de la betterave ou de la canne à sucre. Chez les plantes, le saccharose est un produit de la photosynthèse et représente la forme dominante du transport des glucides. La liaison osidique α (1–2) se fait entre les groupes réducteurs du glucose et du fructose. Le saccharose n'est donc pas réducteur.

Les possibilités de la liaison osidique conduisent à une très grande variété de disaccharides. La *figure V-14* montre ceux pouvant être construits avec seulement deux unités de D-glucose. Onze disaccharides peuvent théoriquement exister. On comprend ainsi la multiplicité des formes glucidiques possibles et des séquences rencontrées dans les polymères biologiques.

MALTOSE

Liaison α (1–4)
glucose - glucose

LACTOSE

Liaison β (1–4)
galactose - glucose

SACCHAROSE

Liaison α (1–2)
glucose - fructose

Fig. V-13 : Exemple de trois disaccharides.

Fig. V-14 : Les différentes possibilités de liaison de deux motifs D-glucose.

3. LES OLIGOSACCHARIDES

Les oligosaccharides sont de petits polymères formés de quelques résidus de sucres. Beaucoup de combinaisons existent tant dans la composition des monomères que dans la nature des liaisons, de telle sorte que leur diversité est très grande. Les oligosaccharides ont généralement une *séquence* précise et dans ce sens ils sont porteurs d'une *information*.

Les oligosaccharides complexes sont rarement à l'état libre. Le plus souvent ils sont associés de façon covalente à des lipides ou à des protéines, constituant ainsi des *glycolipides* et des *glycoprotéines*. Dans les cellules animales les oligosaccharides constituent par exemple les « antennes » de ces macromolécules insérées dans la membrane plasmique. Formant des

arborescences à l'extérieur de la cellule, ils sont des *marqueurs de surfaces,* véritables cartes d'identité cellulaire *(fig. V-15, A).* Ils constituent aussi des séquences très spécifiques attachées à des protéines du sérum.

Dans les cellules végétales les recherches des dernières années ont montré aussi l'importance de courtes séquences oligosaccharidiques comme ***signaux de reconnaissance***. Ces fragments oligosaccharidiques (de 4 à 10 résidus), de structure monotone ou séquencée, font généralement partie intégrante des polysaccharides structuraux constituant la surface des cellules et y jouant un rôle de soutien. Sous l'effet d'une blessure ou d'une interaction avec un agent pathogène par exemple, ces courts fragments sont détachés, deviennent circulants et se comportent alors comme des effecteurs biologiquement très puissants (défense, croissance, reproduction). Ce sont les ***oligosaccharines*** dont le nom a été proposé pour souligner une activité biologique plus ou moins de type hormone. Le mode de liaison des sucres dans ces fragments glucidiques est très précis, le moindre changement de conformation conduisant à une perte d'activité *(fig. V-15, B).*

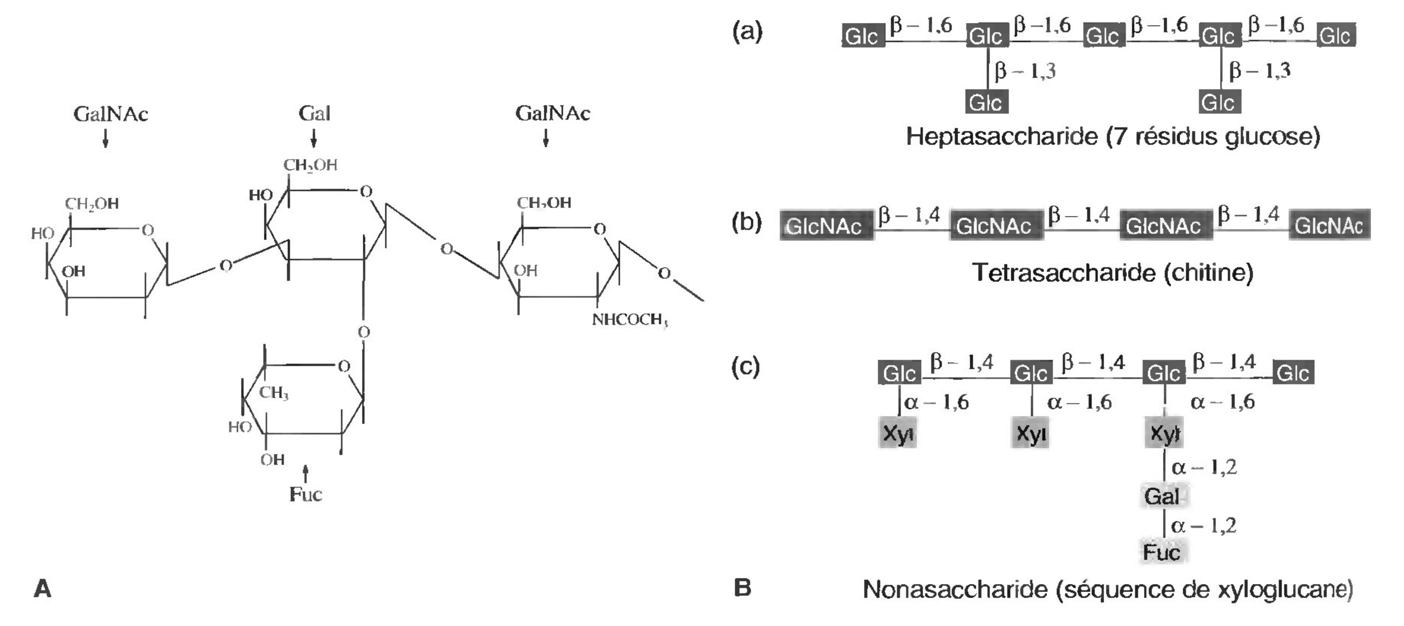


Fig. V-15 : Oligosaccharides.
A) Oligosaccharide d'un groupe sanguin.
B) Oligosaccharides biologiquement actifs dérivés de la paroi de champignons (a et b) et de la paroi de plantes (c).
Glc, glucose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; Xyl, xylose ; Gal, galactose ; Fuc, fucose.

4. LES POLYSACCHARIDES

Les polysaccharides sont des macromolécules constituées d'un très grand nombre de résidus de sucre. L'amidon, le glycogène et la cellulose sont les plus importants, au moins sur le plan pondéral. Ce sont des *homopolymères* dans lesquels le même résidu de sucre est répété des centaines ou des milliers de fois, conduisant à des macromolécules de masse moléculaire importante (10^4 à 10^6). Les homopolymères de type polysaccharidique portent des noms qui dérivent de leur sucre constitutif. Dans le cas de l'amidon, du glyco-

gène et de la cellulose il s'agit de glucose: ce sont donc des *glucanes*.

L'*amidon* est la principale forme de réserve du glucose chez les végétaux. L'amidon est synthétisé et accumulé dans les plastes où il constitue une forme de stockage transitoire. C'est pour la plante un réservoir d'énergie utilisable à tout moment. L'amidon est en fait un mélange de deux glucanes: l'α-amylose et l'amylopectine. L'*α-amylose* est constitué de résidus glucose enchaînés linéairement par des liaisons α (1–4), sans ramifications. Sa masse moléculaire est très variable et la molécule prend une conformation générale en hélice (6 résidus de glucose par tour). L'*amylopectine* au contraire est un homopolymère ramifié. En effet à côté des liaisons α (1–4) existent des liaisons α (1–6) formant des ramifications tous les 10 à 50 résidus dans la chaîne. L'ensemble prend une conformation arborescente *(fig. V-16)*.

Le *glycogène* est la principale forme de réserve du glucose chez les animaux. C'est le glycogène qui fut isolé du foie en 1856 par Claude BERNARD. Sa structure est semblable à celle de l'amylopectine des plantes, les branchements y étant toutefois un peu plus fréquents. Le glycogène est, comme l'amidon, une forme de stockage osmotiquement inactive pour la cellule. Le glycogène stocké dans les cellules du foie sert d'épargne énergétique pour tout l'organisme *(fig. V-16)*.

La *cellulose* est un des matériaux le plus abondamment synthétisé à la surface du globe. On estime la quantité élaborée à 50 ou 100 milliards de tonnes par an. La cellulose représente

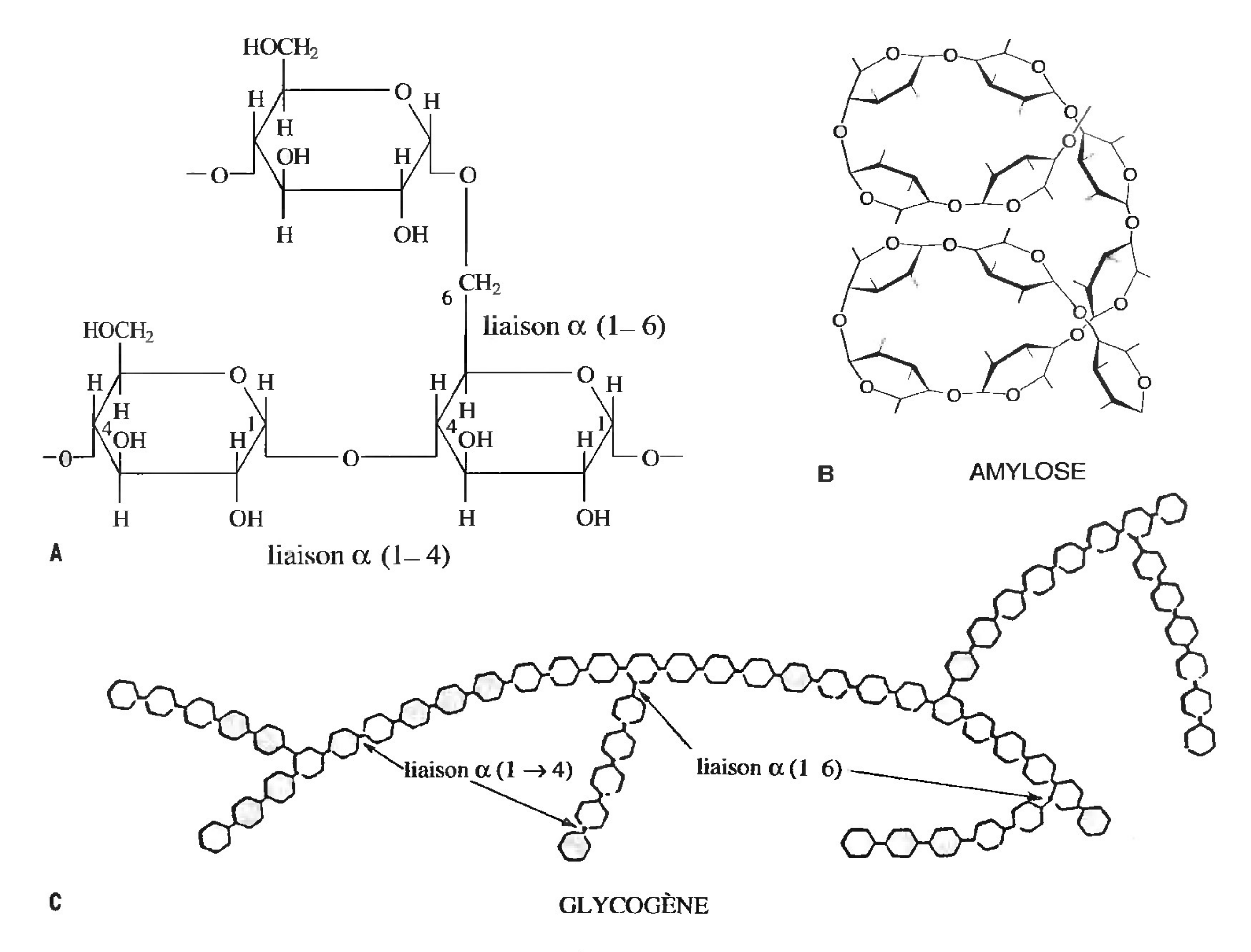


Fig. V-16 : Polysaccharides : amidon et glycogène.
A) Liaisons α (1–4) et α (1–6) de l'amylopectine et du glycogène.
B) Conformation en hélice de l'amylose.
C) Conformation buissonnante du glycogène.

à elle seule 50 % du carbone organique et est donc le polysaccharide le plus important de la biomasse. La cellulose est le matériau de renfort des parois des cellules des plantes supérieures. C'est encore un polysaccharide monotone, constitué d'unités glucose liées en β (1–4), liaison très résistante à l'hydrolyse. Les chaînes ont une conformation rectiligne, et d'une chaîne à l'autre s'établissent des liaisons hydrogène conduisant à la formation de microfibrilles cristallines *(fig. V-17)*. Comme les barres d'acier dans un béton armé, les fibres de cellulose enrobées dans une matrice glycoprotéique donnent à la paroi cellulaire des propriétés de résistance en même temps qu'une grande flexibilité.

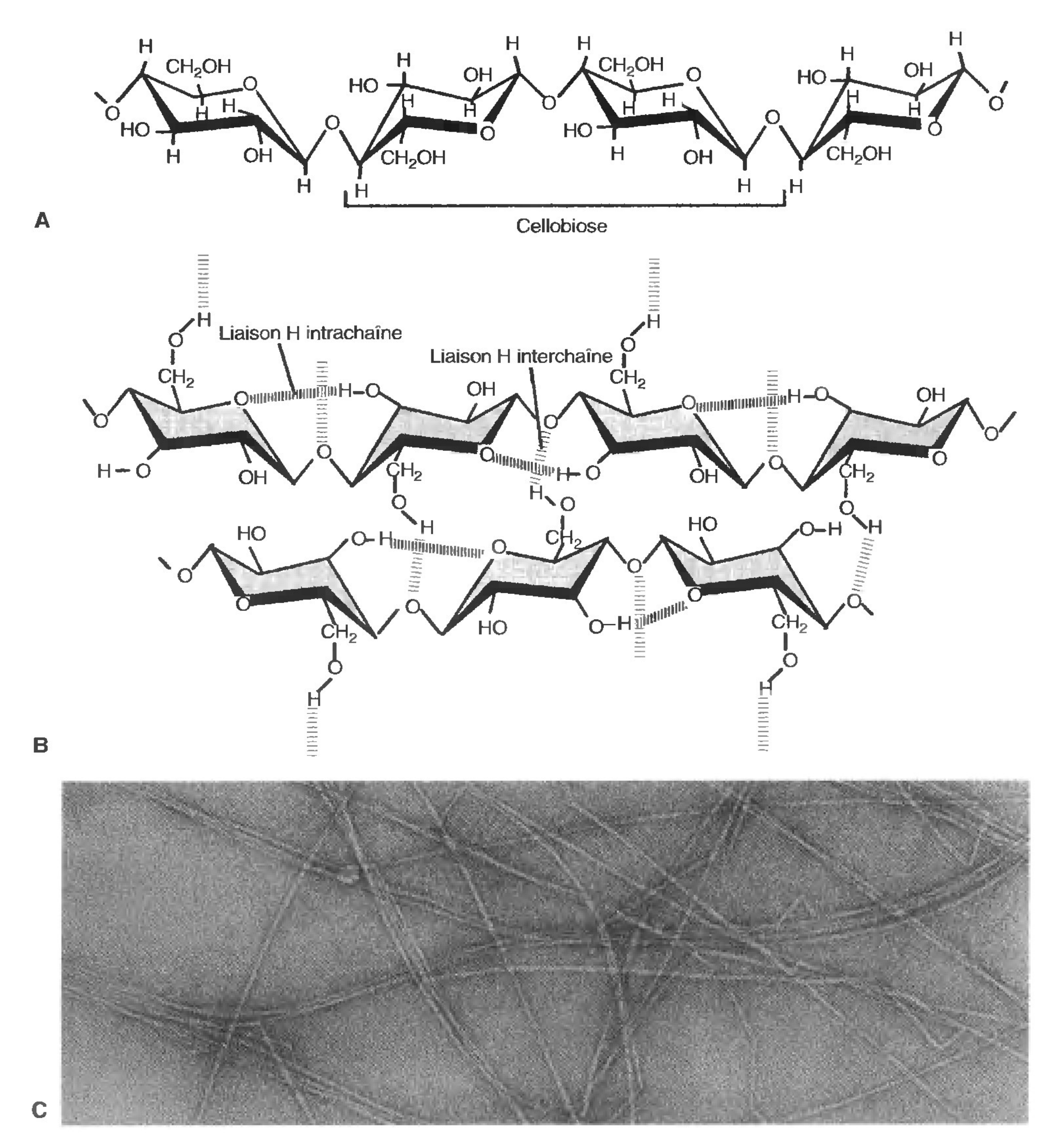


Fig. V-17 : La cellulose. *(Cliché D. REIS.)*
A) Enchaînement en β (1–4) des motifs glucose.
B) Liaisons hydrogène intrachaînes et interchaînes.
C) Microfibrilles de cellulose en contraste négatif.

5. DÉTECTION CYTOCHIMIQUE DES POLYSACCHARIDES

Il est possible de visualiser par voie cytochimique un grand nombre de polysaccharides tant à l'échelle du microscope optique que du microscope électronique. La réaction est fondée sur la détection de deux groupements -OH qui doivent être libres et voisins (*groupements vic-glycols*). La réaction s'effectue en deux étapes *(fig. V-18)* :

– une première étape (étape **a**) conduit à la formation d'aldéhydes par une *oxydation ménagée* du polysaccharide, le plus souvent par de l'acide periodique ;

– une seconde étape rend visibles les fonctions aldéhydes ainsi formées au moyen de divers agents. En microscopie optique le *réactif de Schiff* est directement utilisé, formant avec les aldéhydes un complexe coloré en rouge. On parle dans ce cas de la réaction à l'APS (acide periodique – SCHIFF) (étape **b**). En microscopie électronique un *réactif des aldéhydes*, par exemple la thiocarbohydrazide, est utilisé et visualisé ensuite par des sels d'argents, opaques aux électrons. On parle dans ce cas de la réaction PATAg (acide periodique – thiocarbohydrazide – protéinate d'argent) (étape **c**). La spécificité de la réaction doit, bien entendu, être contrôlée (utilisation d'un autre agent oxydant, omission du passage sur la thiocarbohydrazide).

La *figure V-19* montre le résultat de ce type de test cytochimique appliqué à un matériel végétal. Il s'agit de cellules de cotylédons d'une graine dans laquelle des polysaccharides très réactifs au PATAg sont stockés à titre transitoire dans les parois qui acquièrent ainsi un contraste très élevé.

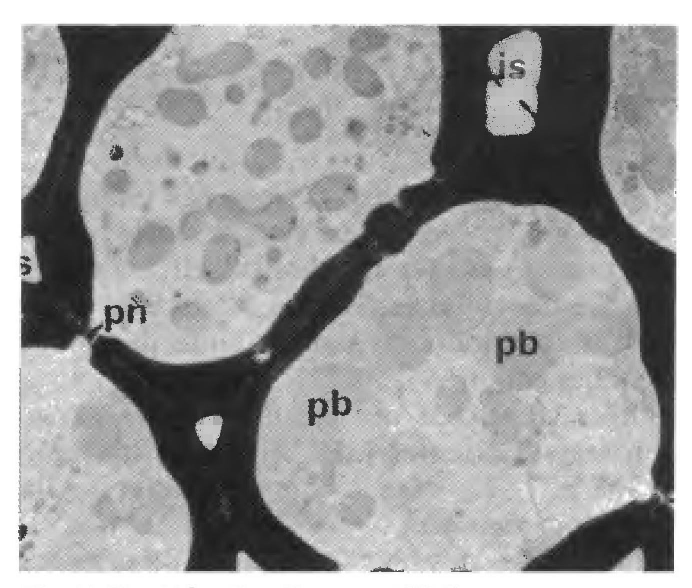


Fig. V-19 : Résultat d'un test PATAg.
Cotylédon de graine de Tamarin. Les polysaccharides de la paroi réagissent fortement; pn, ponctuation; pb, corps protéiques; is, espace intercellulaire G. x 4 000. (*Reproduction de la figure 1.15 de J.C. ROLAND et B. VIAN. General preparation and staining of thin sections. In : J.L. HALL & C. HAWES, eds. Electron Microscopy of plant cells, New York : Acad. Press, 1991 : 1-66.)*

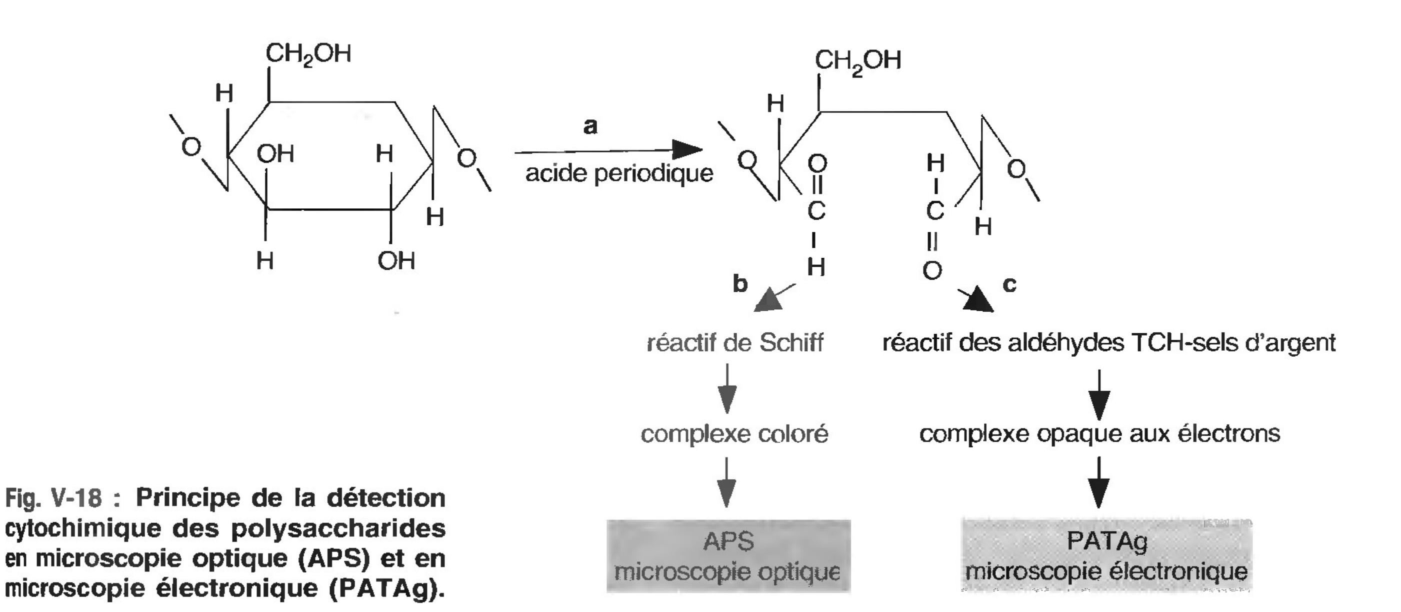


Fig. V-18 : Principe de la détection cytochimique des polysaccharides en microscopie optique (APS) et en microscopie électronique (PATAg).

CHAPITRE VI

Les acides nucléiques et les nucléotides

Les acides nucléiques sont des composés d'importance biologique considérable, comme en témoignent les nombreux articles que la presse de vulgarisation leur consacre et qui n'ont certainement pas manqué de retenir votre attention.

Ces composés ont été découverts par un biologiste allemand, F. Miescher, qui entre 1868 et 1872, durant la guerre Franco-Allemande notamment, isolait les noyaux des cellules du pus des blessés ; à partir de ces organites dont il cherchait à extraire les peptides, il isola des substances nouvelles qu'il appela d'abord substances nucléiques, puis nucléines, ensuite acides nucléiques.

Il apparut très rapidement que ces constituants, représentant 10 à 20 % du poids sec des tissus, devaient être répartis en deux catégories.

D'une part l'acide désoxyribonucléique, l'ADN (ou DNA si l'on emploie la terminologie anglo-saxonne), essentiellement localisé dans le noyau cellulaire.

D'autre part l'acide ribonucléique, l'ARN (ou RNA des anglo-saxons), trouvé dans le noyau et le cytoplasme, mais plus abondant dans ce dernier.

Dans les cellules, ces acides nucléiques sont le plus souvent associés à des protéines formant ce que l'on nomme des nucléoprotéines.

1. L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE OU ADN

C'est une molécule généralement de taille considérable. Par exemple, la molécule d'acide désoxyribonucléique trouvée dans le nucléoïde de la bactérie *Escherichia coli*, le colibacille, a une masse moléculaire de 2600 millions de daltons ; elle est cependant considérée comme une petite molécule d'ADN.

C'est donc une macromolécule, fragile en raison de sa très grande longueur, difficile à obtenir sans rupture, c'est-à-dire à l'état natif, celui où elle se trouve dans les cellules. Cependant, elle est aisément extraite des noyaux car elle est très soluble dans les électrolytes dilués.

C'est une macromolécule, elle est donc constituée par l'enchaînement d'un nombre élevé de monomères. Ce sont eux qui seront d'abord étudiés.

1.1 HYDROLYSE TOTALE DE LA MOLÉCULE

Elle est obtenue par traitement de la solution d'ADN par HCl 6N, à 120 °C durant 2 heures. Trois constituants sont alors identifiables : l'acide phosphorique, un ose – le désoxyribose (qui donne son nom à la molécule) – et des bases azotées.

A. L'acide phosphorique

De formule PO_4H_3, il est ionisé au pH cellulaire :

$$O = P(O^-)_3$$

Il possède trois fonctions acides : c'est donc un composé très réactif.

B. Le désoxyribose

C'est un ose à 5 atomes de carbone, donc un pentose, toujours cyclisé sous la forme furanose *(fig. VI-1)*, par suite de la formation d'un pont oxydique entre les carbones 1' et 4'. La numérotation des carbones est affectée d'un exposant prime (') pour éviter toute confusion avec les numéros des carbones des autres constituants de l'ADN. **La forme de la molécule et la numérotation de ses carbones doivent impérativement être connues** car le rôle de ce pentose est fondamental dans la constitution de l'ADN.

Il comporte *trois fonctions alcool* : une fonction alcool primaire portée par le carbone 5', deux fonctions alcool secondaire au niveau des carbones 1' et 3'. Comportant de nombreux hydroxyles, c'est un *composé très réactif et très soluble dans l'eau.*

C. Les bases azotées

On en trouve quatre différentes dans l'ADN. Ce sont des *hétérocycles azotés*, c'est-à-dire que les sommets des cycles sont occupés par des atomes d'azote et de carbone.

Fig. VI-1 : Molécule de désoxyribose.

Celles dérivées de la pyrimidine, hétérocycle à 4 atomes de carbone et 2 atomes d'azote, sont les bases pyrimidiques. On en trouve deux dans l'ADN : la **cytosine** et la **thymine** *(fig. VI-2).*

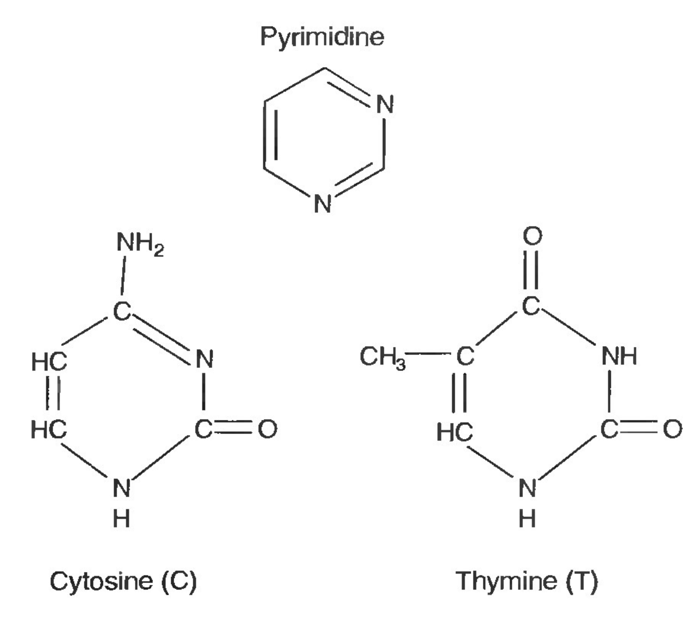


Fig. VI-2 : Bases pyrimidiques.

Celles dérivées de la purine, qui résulte elle-même de la condensation de la pyrimidine et de l'imidazole, sont les bases puriques. On en rencontre deux dans l'ADN : l'**adénine** et la **guanine** *(fig. VI-3).*

Les doubles liaisons et la nature cyclique confèrent une grande rigidité à ces molécules : *ce sont des molécules planes.* Ces bases sont pour l'essentiel hydrophobes, mais certains de leurs atomes, engagés dans des liaisons covalentes, sont susceptibles d'établir des liaisons hydrogène, nous en verrons toute l'importance ultérieurement.

La présence de liaisons conjuguées confère également à ces molécules la propriété d'absorber fortement les photons ; ce sont ceux dont la longueur d'onde est voisine de 260 nm qui sont retenus, c'est-à-dire que *ces bases absorbent fortement dans l'ultraviolet,* ce qui est un moyen de les caractériser.

Cette hydrolyse complète informe toutefois peu sur la structure de la molécule.

Purine

Imidazole Pyrimidine

Guanine (G)

Adénine (A)

Fig. VI-3 : Bases puriques.

1.2. HYDROLYSE PARTIELLE DE LA MOLÉCULE

Elle peut être obtenue par hydrolyse enzymatique, par *les désoxyribonucléases*.

Fait remarquable, les produits ainsi libérés sont seulement du type :

Base + Désoxyribose
ou
Base + Désoxyribose + Phosphate

On n'obtient jamais de constituants résultant de l'association :

Base + Phosphate

Ceci implique que le monomère de l'ADN est formé par l'association des 3 molécules, obtenues à partir de l'hydrolyse totale, dans un ordre bien déterminé : *Base-Sucre-Acide phosphorique*.

Le constituant le plus fréquemment obtenu, après hydrolyse partielle, est formé par l'union de la fonction alcool portée par le $C_{1'}$ du désoxyribose (groupement pseudo-aldéhydique) et un NH d'une base azotée, avec élimination d'une molécule d'eau. **C'est la liaison N-glycosidique**. Le composé ainsi formé prend le nom de *nucléoside* ou plus précisément, puisqu'il est constitué à partir du désoxyribose, de *désoxynucléoside (fig. VI-4)*.

Il existe donc quatre désoxynucléosides selon la base avec laquelle ils sont constitués.

Les désoxynucléosides pyrimidiques, dont le nom se termine en « *idine* », sont :

la **désoxythymidine** (désoxyribose + thymine),
la **désoxycytidine** (désoxyribose + cytosine).

Les désoxynucléosides puriques, dont le nom se termine par « *osine* » sont :

la **désoxyguanosine** (désoxyribose + guanine),
la **désoxyadénosine** (désoxyribose + adénine).

La liaison N-glycosidique des nucléosides puriques est plus fragile que celle des nucléosides pyrimidiques ; elle se rompt facilement par une hydrolyse ménagée : HCl N à 60 °C pendant 10 minutes.

La fonction pseudoaldéhyde du désoxyribose est alors accessible ; elle peut être mise en évidence par le réactif caractéristique des aldéhydes, *le réactif de Schiff* (fuchsine décolorée par SO_2).

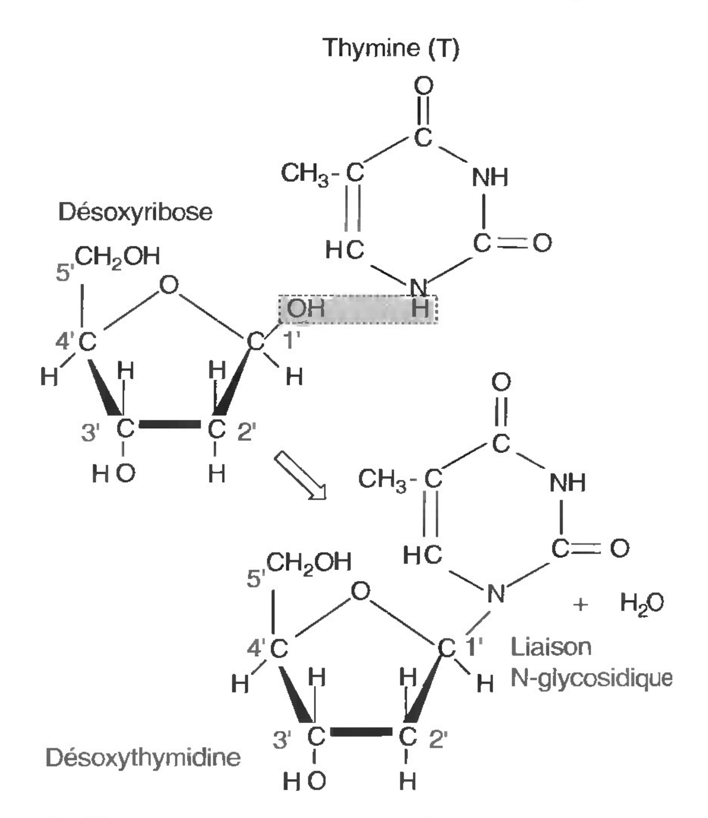


Fig. VI-4 : Formation d'un nucléoside.

Cette hydrolyse ménagée, suivie d'une caractérisation des aldéhydes par le réactif de Schiff, permet de localiser avec grande précision l'ADN dans la cellule. ***C'est la réaction de Feulgen.*** C'est une réaction cytochimique très précise, très utilisée par les microscopistes, qui colore l'acide désoxyribonucléique en rouge violacé.

Les résultats de l'hydrolyse ménagée montrent que ces nucléosides sont liés à un acide phosphorique, PO_4H_3. C'est un triacide et le désoxyribose est un trialcool ; il y a donc possibilité d'estérification. Dans le cas de l'ADN, cette **liaison ester** s'établit entre l'acide et la fonction alcool primaire portée par le carbone 5' du désoxyribose : on a formation d'un *nucléotide* que l'on doit appeler, pour le qualifier complètement, un *désoxynucléoside 5' monophosphate (fig. VI-5).*

Un nucléotide est donc un ester phosphorique d'un nucléoside.

Liaison ester

Désoxythymidine 5' monophosphate

Fig. VI-5 : Formation d'un nucléotide.

De même qu'il y avait 4 désoxynucléosides, il y a 4 désoxynucléotides qui entrent dans la composition de l'ADN :

Les pyrimidiques :

la désoxythymidine 5'monophosphate ou dTMP,
la désoxycytidine 5' monophosphate ou dCMP.

Les puriques :

la désoxyadénosine 5'monophosphate ou dAMP,
la désoxyguanosine 5'monophosphate ou dGMP.

1.3. LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'ADN

Si l'on ne tient pas compte de la nature des bases, tous les constituants de l'ADN sont en proportions équimoléculaires (n désoxyriboses = n PO_4H_3 = n bases azotées) : *le nucléotide est donc l'élément de base,* ***le monomère,*** *de l'ADN.* La question qui se pose est donc de savoir comment s'effectue l'enchaînement de ces nucléotides.

Dans un nucléotide, une fonction acide de l'acide phosphorique est engagée dans une estérification, il reste donc deux fonctions acide libres ; parmi les trois fonctions alcool du désoxyribose, une participe à la formation de la liaison N-glycosidique, une autre est engagée dans la liaison ester, il reste donc une fonction alcool libre, celle portée par le carbone 3'.

L'enchaînement des nucléotides s'effectue donc par *estérification* entre la fonction alcool du carbone 3' du désoxyribose d'un premier nucléotide et l'une des fonctions acide du PO_4H_3 d'un autre *(fig. VI-6)* ; il y a formation d'un *dinucléotide*, puis si l'enchaînement se poursuit, d'un *trinucléotide* et enfin d'un *polynucléotide.*

Tous les acides phosphorique de ce polynucléotide, à l'exception de celui porté par le premier nucléotide, sont liés à deux désoxyriboses par des liaisons ester ; on dit que la molécule est constituée par un ***squelette polydésoxyribose-phosphate*** maintenu par des ***liaisons phospho-diesters***, les bases étant situées latéralement.

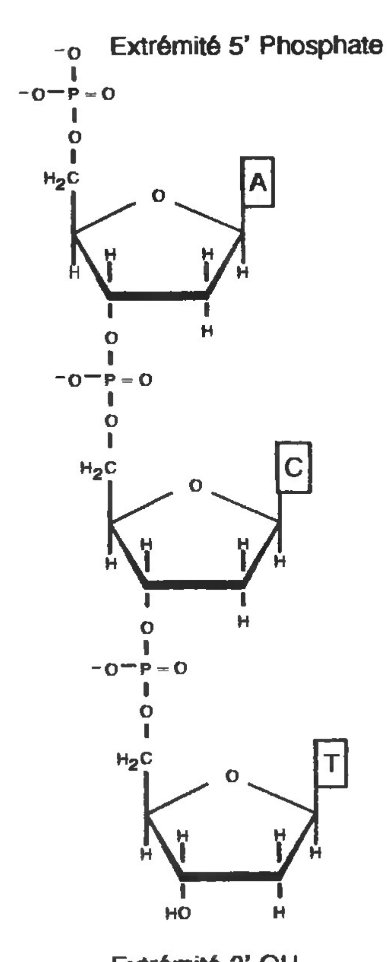


Fig. VI-6 : **Un trinucléotide.**

Cette organisation moléculaire a des conséquences extrêmement importantes :

1) Le nombre des monomères enchaînés peut être énorme, souvent plusieurs millions de nucléotides ; ce sont donc de ***volumineuses macromolécules***.

2) Le phosphate du premier nucléotide de la molécule est libre; il est lié au carbone 5' du premier désoxyribose du squelette macromoléculaire : en conséquence, *il est possible d'orienter la molécule*, une extrémité étant la **5'phosphate**, l'autre la **3'OH** puisqu'on y note la présence d'un hydroxyle libre, celui porté par le carbone 3' du dernier désoxyribose.

3) L'acide phosphorique a une fonction non engagée dans une liaison; au pH de la cellule, cette fonction est ionisée, on parle donc de *groupement phosphate* ; celui-ci chargé négativement confère *des propriétés anioniques* à la molécule qui, en conséquence, est très réactive.

4) Les 4 types de désoxynucléotides entrent dans la constitution de la macromolécule et, en la parcourant de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', on peut établir l'ordre de succession des bases situées à l'extérieur du squelette désoxyribose-phosphate : ***c'est la séquence***. Celle-ci personnalise la molécule. En outre. cette séquence peut exprimer un message dans la mesure où il existe un code constitué à partir de ces 4 lettres que sont les 4 désoxynucléotides : ***les polynucléotides de l'ADN sont des molécules informationnelles***.

1.4. PROPRIÉTÉS DE LA MOLÉCULE : NÉCESSITÉ D'UNE STRUCTURE SECONDAIRE

Plusieurs propriétés physiques et chimiques de la molécule d'ADN, certaines particularités de son organisation et son rôle dans la cellule suggèrent que cette macromolécule ne se trouve pas sous la forme d'un simple polynucléotide.

C'est en tenant compte de ces propriétés et de ces particularités que **WATSON** et **CRICK** ont pu proposer le modèle maintenant universellement admis de la double hélice. Voyons d'abord quelles sont ces propriétés et particularités.

A. *Les propriétés physiques*

a) La densité et la viscosité de l'ADN, lorsqu'il est extrait des cellules avec précaution, donc sous sa forme native, sont plus importantes que celles d'une simple chaîne polynucléotidique.

b) L'absorption des UV par l'ADN *(fig. VI-7)* est due, nous l'avons vu, à l'existence de doubles liaisons, des liaisons conjuguées, dans le cycle des bases, qui absorbent très fortement les photons vers 260 nm.

Si l'on fait traverser une solution d'ADN par un faisceau lumineux dont la longueur d'onde varie autour de 260 nm, on pourra établir une courbe, le spectre d'absorption des photons UV par les bases puriques et pyrimidiques *(fig. VI-7, courbe 1)*. Cette absorption est nettement inférieure à celle que l'on

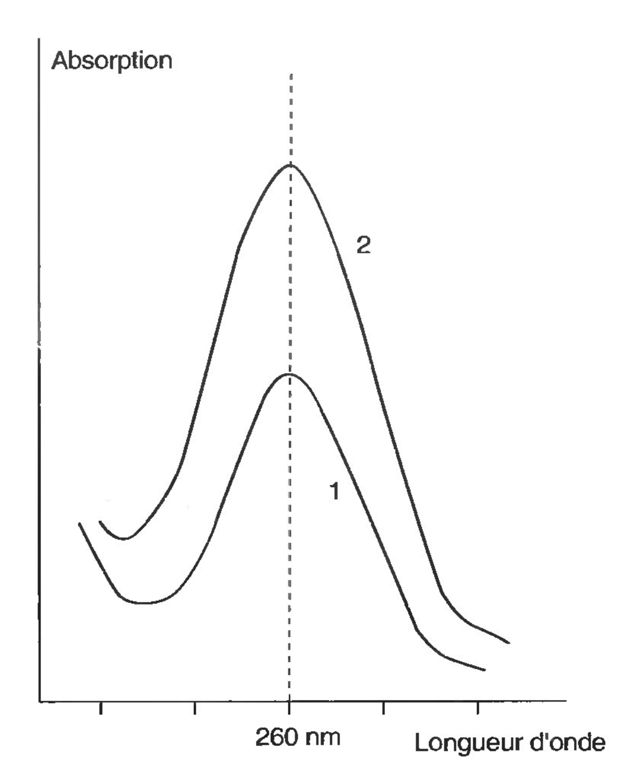


Fig. VI-7 : Absorption des radiations UV par l'ADN natif (courbe 1) et par l'ADN dénaturé (courbe 2). *(D'après THOMAS, 1953.)*

obtiendrait avec un mélange de bases aux mêmes concentrations ou après que la solution aura été chauffée vers 110 °C et refroidie brutalement *(fig. VI-7, courbe 2)*; le chauffage ayant la propriété de rompre les liaisons faibles, on est conduit à penser que, dans l'ADN natif, les polynucléotides adoptent une *structure secondaire maintenue par des liaisons faibles*. Si le chauffage est remplacé par un traitement par l'urée, agent dénaturant, le résultat obtenu est identique.

c) Les diagrammes de diffraction des rayons X, réalisés par WILKINS et FRANKLIN, ont montré que l'ADN présente une organisation en hélice et que les bases puriques et pyrimidiques, épaisses de 0,34 nm, sont *empilées perpendiculairement à l'axe de l'hélice*.

B. Les particularités de la molécule concernant les bases azotées

Les fonctions caractéristiques des bases, notamment les fonctions NH_2, sont masquées sur l'ADN natif alors qu'elles ne le sont pas sur les polynucléotides.

Mais c'est surtout leur nombre relatif, *le rapport existant entre elles*, qui est intéressant. Lorsqu'on détermine le nombre des différentes bases présentes dans une molécule on a toujours autant d'adénine que de thymine et autant de cytosine que de guanine, ce que l'on traduit ainsi :

$$A = T \quad \text{et} \quad C = G \quad \text{et} \quad \frac{A}{T} = 1 \quad \frac{C}{G} = 1$$

Par contre le rapport : $\dfrac{A + T}{C + G}$

est très variable. Il est de 1,40 chez l'homme, de 1,86 chez l'oursin, 0,97 chez *Escherichia coli*. Ce rapport est en quelque sorte caractéristique de l'organisme.

C. Le rôle de l'ADN

Bien entendu vous n'ignorez pas que cette molécule constitue le support chimique de l'hérédité ; le dire actuellement est devenu une banalité. Mais cette notion fut acquise très tardivement, en 1944, et elle a bouleversé les mentalités et de nombreux concepts philosophiques et religieux ; la découverte de ce rôle a entraîné une quantité considérable de travaux sur les macromolécules biologiques et l'on peut dire qu'elle est à l'origine du développement de la biologie moléculaire actuelle.

Les travaux qui ont permis d'aboutir à cette notion, « l'hérédité a un support chimique », ont débuté en 1928 avec les expériences de Frederick GRIFFITH sur une bactérie, le pneumocoque, agent responsable d'une grave maladie, la pneumonie. Plusieurs souches de cette bactérie avaient été isolées, différant les unes des autres par la nature chimique de leur capsule. Ces souches appelées I, II, III, étaient toutes virulentes et, injectées à un rat, déclenchaient la maladie qui entraînait rapidement la mort de l'animal *(fig. VI-8, A)*. À partir de chacune de ces souches, des mutants avaient été isolés ; dépourvus de capsule ils étaient incapables de déclencher la maladie ; ils étaient non virulents *(fig. VI-8, B)*. C'est en effet la capsule qui protège la cellule bactérienne des défenses de l'hôte. Cultivées en boîtes de Pétri, les bactéries virulentes pour-

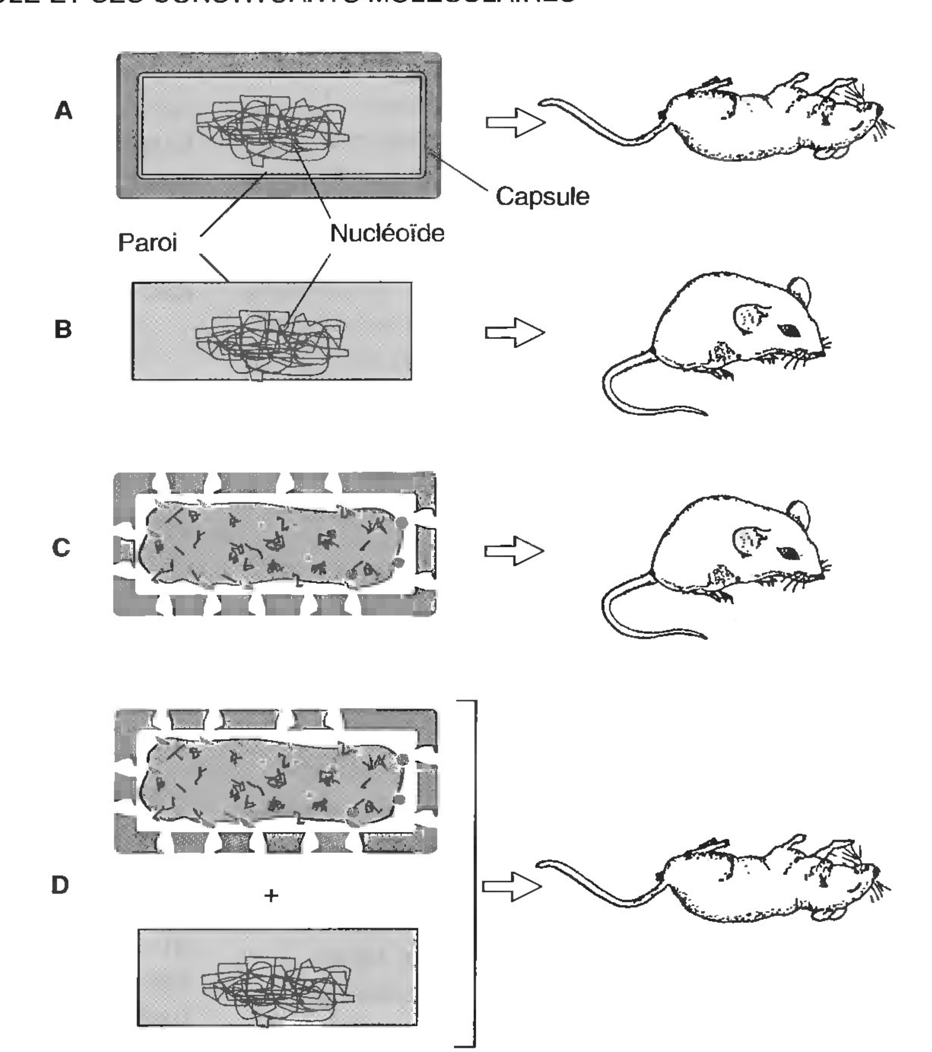


Fig. VI-8 : Les expérience de Griffith et la transformation bactérienne.

A) Les pneumocoques de type s, pourvus d'une capsule, provoquent la mort du rat auquel ils ont été injectés quelle que soit la souche à laquelle ils appartiennent (I, II, III...).

B) Les pneumocoques de type r, dépourvus de capsule, n'entraînent pas la mort de l'animal auquel ils sont injectés.

C) Les pneumocoques de type s, traités par la chaleur, n'ont aucune action sur le rat.

D) L'injection simultanée d'une bactérie de type s provenant d'une souche I, détruite par la chaleur, et d'une bactérie non virulente de type r appartenant à une souche II déclenche la pneumonie chez le rat; la bactérie a été transformée.

vues de capsules formaient des colonies lisses, *smooth* en anglais, et furent baptisées « s ». Les colonies des formes non virulentes, bactéries sans capsules, avaient un aspect irrégulier, *rough* en anglais, elles furent appelées « r ».

Lorsque les souches virulentes, *Is* par exemple, sont tuées par la chaleur, leur injection au rat ne provoque aucun trouble *(fig. VI-8, C)*.

Ces observations, bien qu'intéressantes, ne sont pas surprenantes. Par contre l'expérience qui étonna beaucoup Griffith fut celle où l'injection simultanée d'une souche *Is* tuée par la chaleur et d'une souche *IIr (fig. VI-8, D)* déclencha une pneumonie chez un rat qui mourut rapidement.

À partir du cadavre du rat tué de cette manière, Griffith put isoler des bactéries virulentes présentant les caractéristiques capsulaires de la souche I, c'est-à-dire des *Is*.

S'il s'était agi d'une simple mutation en retour, celle-ci aurait restitué la virulence à la souche *II* et à partir du cadavre, ce sont des *IIs* qui auraient été isolées. Comme par ailleurs il était exclu que les bactéries de la souche *Is* tuées par la chaleur aient ressuscité, *Griffith conclut que la présence des cellules Is tuées avait permis* ***la transformation*** *des cellules sans capsules de type II en cellules capsulées de type I* et celles-ci mises en culture donnaient naissance à des colonies Is *: la transformation est stable et inscrite dans le patrimoine génétique.*

Des expériences complémentaires permirent de préciser les caractères de la transformation. Tout d'abord celle-ci peut avoir lieu en dehors de l'animal. En effet, si on ajoute, à une culture de bactérie non virulente de type *II* (*IIr*), des bactéries virulentes tuées par la chaleur (*Is*), on constate au bout d'un certain temps que le milieu contient des bactéries vivantes *Is* qui injectées à un rat déclenchent une pneumonie.

Mieux encore le même résultat est obtenu lorsqu'un extrait brut de bactéries *Is* est ajouté à la culture non virulente *IIr.*

Ces expériences démontrèrent que la transformation était due à un agent médiateur non cellulaire, à ***un facteur transformant.***

Dans les années 1940, AVERY, McLEOD et McCARTHY cherchèrent à déterminer la nature chimique de ce facteur transformant. Utilisant divers procédés de purification, ils obtinrent une substance qui était capable d'induire la transformation à une concentration aussi faible que 1 partie par million. La seule enzyme susceptible de faire perdre son pouvoir transformant à la solution était la désoxyribonucléase ; ils conclurent donc en 1944 que ***l'ADN était le facteur transformant*** et que cette molécule devait être considérée comme le support chimique de l'hérédité.

Le mécanisme de la transformation demeurait cependant mystérieux ; on sait maintenant que la destruction par la chaleur, ou tout autre procédé tuant les bactéries virulentes, fractionne la molécule d'ADN contenue dans la cellule *(fig. VI-9, A puis B)*. Si un fragment portant l'information nécessaire à la synthèse d'une capsule *(S, fig. VI-9, C)* est absorbé par une bactérie vivante, non virulente *(fig. VI-9, D et E)*, il peut se substituer à la portion d'ADN correspondante dans cette cellule, celle où avait eu lieu la mutation, et qui était donc incapable d'induire la synthèse d'une capsule (s). Ce remplacement doit être effectué avec grande précision, c'est-à-dire que la portion d'ADN muté doit être éliminée pour que l'ADN importé puisse s'y substituer. Ce dernier peut dès lors induire la formation d'une capsule mais celle-ci est de type *I*, il y a bien eu transformation *(fig. VI-9, F et G)*.

Il convient de souligner combien est faible la probabilité pour qu'une telle transformation soit réalisée. Il faut en effet que la fraction d'ADN coupée par la chaleur porte la totalité de l'information concernant la capsule, il faut également que ce fragment soit absorbé par une bactérie non virulente, il faut ensuite que ce fragment se substitue dans l'ADN cellulaire à celui qui avait été muté ; il y a donc beaucoup d'aléas et c'est seulement parce que les cellules bactériennes sont très nombreuses et surtout parce qu'elles ont un rythme de multiplication extraordinairement rapide que ce processus est possible.

Cette notion, l'existence d'un support chimique pour l'hérédité, bouleversa les conceptions de l'époque et donna un nouvel élan aux recherches entreprises sur la molécule d'ADN, sur l'organisation que celle-ci pouvait avoir, organisation qui devait permettre d'expliquer ses remarquables propriétés. Ce sont donc les résultats de très nombreux chercheurs qui permirent à WATSON et CRICK en 1953 de proposer, dans un brillant travail de synthèse, le modèle en double hélice.

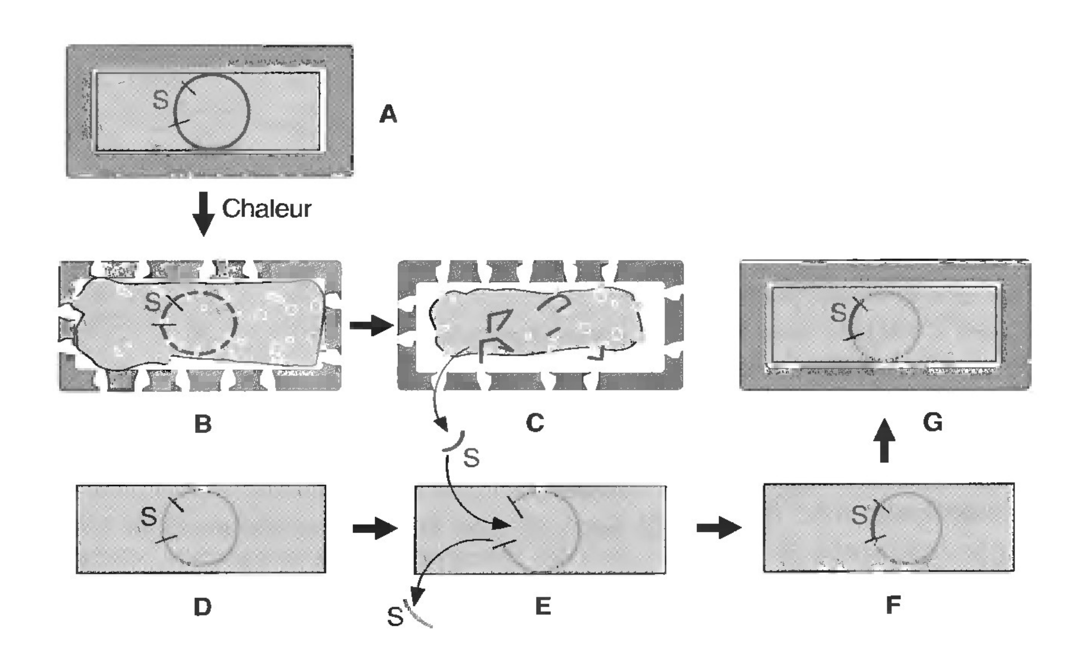


Fig. VI-9 : Mécanisme de la transformation.

1.5. LA DOUBLE HÉLICE, STRUCTURE SECONDAIRE DE L'ADN

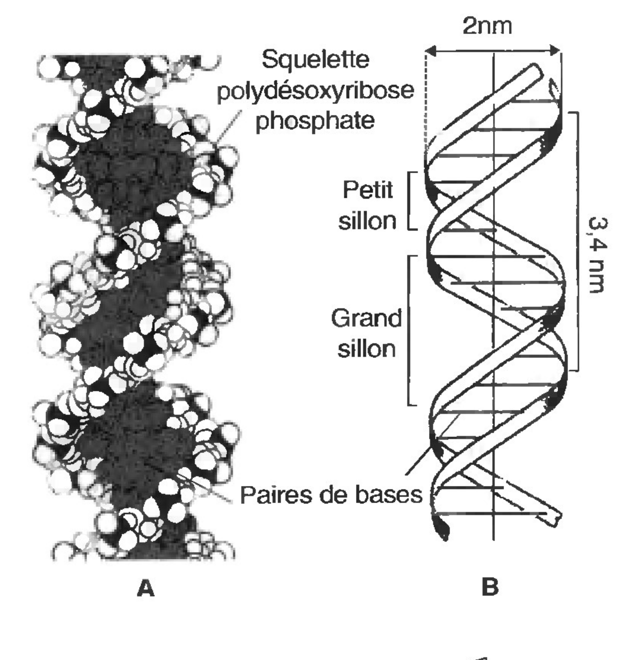
Dans ce modèle, maintenant unanimement admis, la molécule d'ADN est constituée par deux chaînes polynucléotidiques orientées de manière *antiparallèle*, maintenues associées par des liaisons faibles établies entre les bases occupant la partie centrale ; les squelettes polydésoxyribose-phosphate forment chacun une hélice, l'axe d'enroulement étant le même pour les deux polynucléotides *(fig. VI-10, A)*. La molécule d'ADN est *bicaténaire*. Cette double hélice a un pas constant, 3,4 nm, et elle s'inscrit dans un cylindre régulier de 2 nm de diamètre *(fig. VI-10, B)*.

Ce diamètre constant tient au mode d'association des bases : *à chaque niveau il y a toujours une base purique et une base pyrimidique (fig. VI-10, C)* ; il n'y a jamais deux puriques ou deux pyrimidiques. Toutes les bases puriques sont constituées à partir du même noyau ; il en est de même pour les pyrimidiques. Il s'ensuit que, quelles que soient les bases associées, le volume occupé est toujours le même et, par voie de conséquence, le diamètre de l'hélice est régulier.

La cohésion de l'ensemble est due aux associations entre les bases. Celles-ci sont plutôt hydrophobes et, leur plan d'étalement étant pratiquement orthogonal avec celui du désoxyribose *(fig. VI-10, C)*, elles vont s'empiler au centre de la molécule. Les interactions mises en œuvre au cours de ce regroupement sont cependant très faibles et elles seraient insuffisantes pour assurer le maintien de l'ensemble ; celui-ci est dû à des *liaisons hydrogène* établies entre groupements légèrement chargés portés par les bases azotées. Si l'on examine la disposition des groupes portés par les cycles des bases, on constate que **la cytosine et la guanine peuvent établir 3 liaisons H, la thymine et l'adénine seulement 2** *(fig. VI-11)*.

Si donc l'on tient compte de l'obligation liée à l'encombrement stérique (une base purique affrontée à une pyrimidique) et des possibilités d'établissement des liaisons H (rappelons que pour que ces liaisons puissent s'établir il est nécessaire que les charges impliquées soient complémentaires et suffisamment proches l'une de l'autre [δ^+ suffisamment proche de δ^-]), ***seules deux combinaisons sont possibles : A–T et C–G*** *(fig. VI-11)* ; toutes les autres sont impossibles *(fig. VI-12)*.

Il s'ensuit que dans la molécule d'ADN les polynucléotides sont non seulement antiparallèles, *ils sont aussi complémentaires (fig. VI-13)*. Il est dès lors très important de constater que si l'on connaît la séquence d'un polynu-



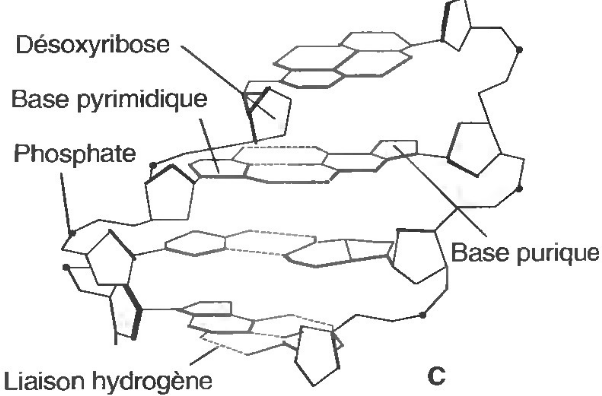


Fig. VI-10 : Molécule d'ADN.
A) Modèle moléculaire à boules.
B) Représentation schématique et dimensions de la molécule.
C) Reconstitution tridimensionnelle montrant l'orientation des bases par rapport au squelette polydésoxyribose phosphate.
(Les bases sont figurées en rouge.)

CH_3
O
H
H
N
N
N
H
N
Désoxyribose
O
N
Thymine
Liaisons H
N
N
Désoxyribose

A

Adénine

H
N
H
O
N
N
H
N
Désoxyribose
O
H
N
N
Cytosine
H
Désoxyribose

B

Guanine

Fig. VI-11 : Liaisons hydrogène entre bases.
A) Deux liaisons H entre adénine et thymine.
B) Trois liaisons H entre guanine et cytosine.

H
N
H
H
N
H
N
N
Désoxyribose
O
N
N
N
N
Cytosine
Désoxyribose

Adénine

Fig. VI-12 : Pas de liaisons H possibles entre cytosine et adénine.

cléotide *on peut très simplement reconstituer celui auquel il est associé* pour former la molécule d'ADN.

La forme de la molécule est parfaitement déterminée; on y reconnaît deux sillons: le grand sillon qui sépare deux tours de spire, le petit sillon situé entre les deux polynucléotides associés *(fig. VI-10)*.

Les groupements phosphate chargés négativement sont situés à l'extérieur de la molécule, lui conférant des **propriétés anioniques** *(fig. VI-13)*.

Les molécules ainsi constituées sont volumineuses, 2 600 millions de daltons et une longueur de 1 400 µm pour la « petite » molécule d'ADN constituant l'unique chromosome

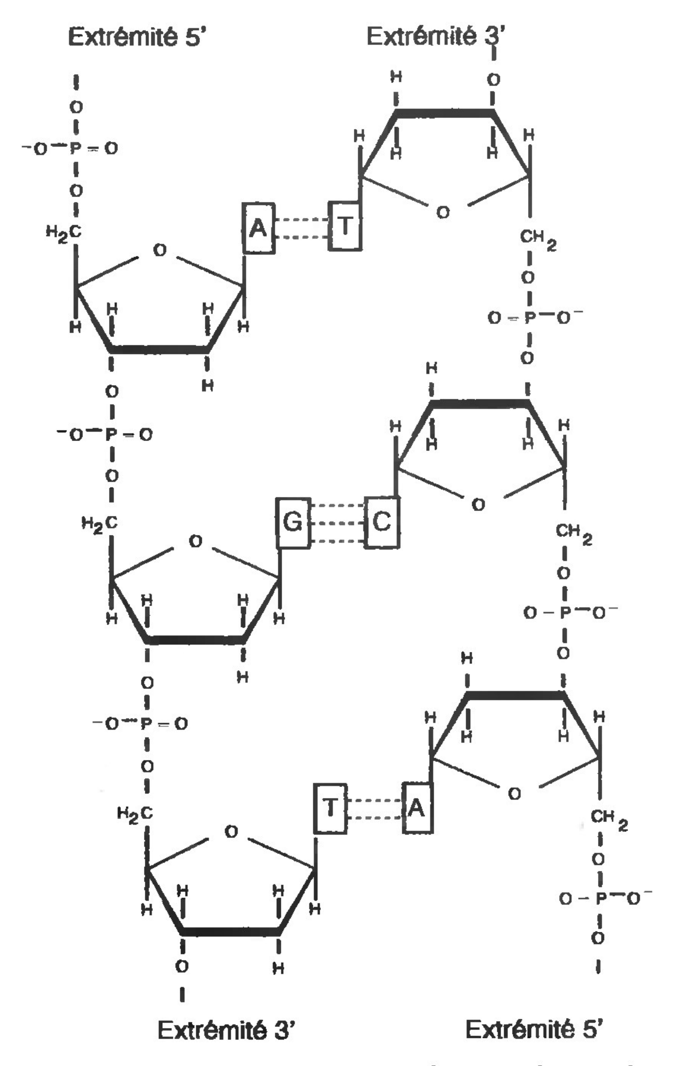


Fig. VI-13 : Disposition antiparallèle des deux polynucléotides complémentaires de la molécule d'ADN (figuration dans un plan).

d'*Escherichia coli*, le colibacille. Ces longueurs peuvent être énormes chez les Eucaryotes et on utilise pour estimer leur importance une unité nouvelle, ***la paire de bases (pb),*** qui rend mieux compte des propriétés de la molécule. La longueur du chromosome du colibacille est évaluée à 4 millions de paires de bases.

1.6. LA DOUBLE HÉLICE ET LES PROPRIÉTÉS DE L'ADN

Tout modèle proposé pour une molécule doit pouvoir rendre compte des propriétés de cette molécule. La démarche scientifique implique en effet la vérification des propositions.

a) Densité et viscosité

Molécule plus volumineuse qu'un simple polynucléotide, la molécule d'ADN sera à la fois plus lourde et plus rigide, donc plus dense et plus visqueuse.

b) Absorption des UV

Si l'on suit quantitativement l'absorption des UV par une solution d'ADN chauffée progressivement, on constate que cette absorption augmente régulièrement à partir de 70 °C pour atteindre un maximum autour de 110 °C; ce que traduit la courbe de la *figure VI-14*.

L'augmentation de l'agitation thermique, liée à l'élévation de température, rompt les liaisons hydrogène. La séparation des deux polynucléotides ne sera toutefois pas régulière car les portions de double hélice où l'on trouve en très grande quantité des couples A–T (maintenus seulement par deux liaisons H) seront dissociées plus rapidement que celles où l'on rencontre majoritairement des couples C–G (trois liaisons H) plus résistants. On va donc avoir une séparation progressive des deux chaînes ; elle sera complète à 110 °C : il y a *fusion de l'ADN* (terme impropre mais consacré par l'usage; en fait il y a dénaturation). La molécule d'ADN est complètement déspiralisée et les polynucléotides la composant séparés : *l'ADN est devenu monocaténaire*, **il est dénaturé**. L'absorption des UV ne fait que refléter l'accessibilité de plus en plus importante des bases qui ne sont plus assemblées par des liaisons H lorsque progresse la dissociation des nucléotides.

Les courbes de fusion différeront sensiblement d'un ADN à l'autre puisqu'elles dépendent des proportions relatives et de la répartition le long de la molécule des groupes de couples C–G et A–T.

Il est particulièrement intéressant de suivre l'évolution du système après fusion de l'ADN lorsque la solution se refroidit. La courbe montre que si ce refroidissement est lent, l'absorption UV revient progressivement aux valeurs initiales *(fig. VI–15)*; par contre si le refroidissement est brutal, l'absorption reste à un niveau très élevé pendant très longtemps *(fig. VI–16)*. En termes moléculaires cela signifie que les polynucléotides dissociés le restent

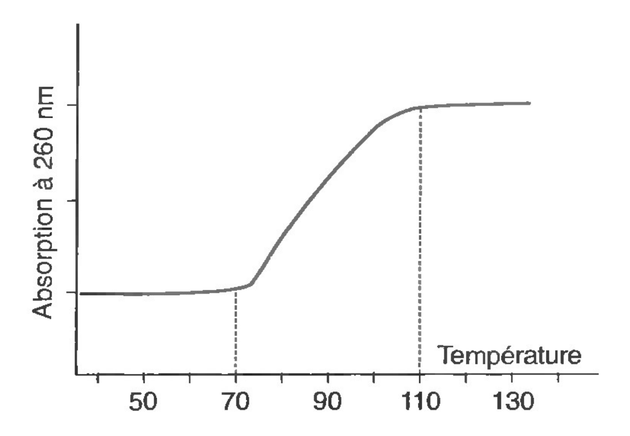


Fig. VI-14 : Absorption des UV par une solution d'ADN chauffée progressivement.

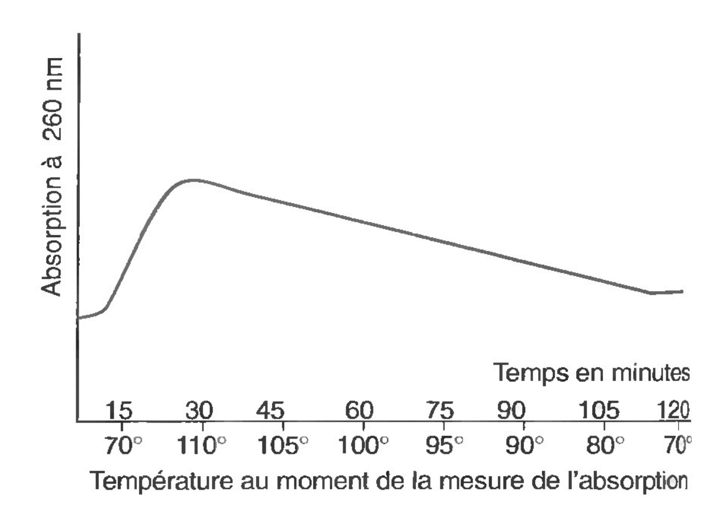


Fig. VI-15 : Absorption des UV par une solution d'ADN dénaturé refroidie lentement.

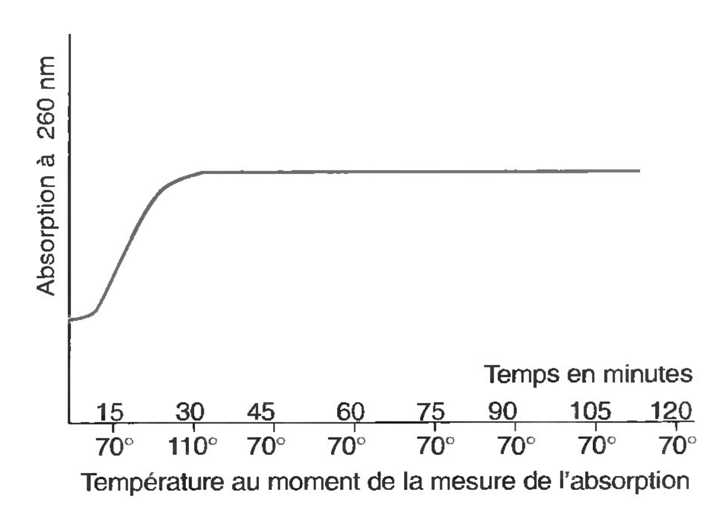


Fig. VI-16 : Absorption des UV par une solution d'ADN dénaturé refroidie brutalement.

dans le second cas, alors qu'ils se réassocient progressivement lorsque le refroidissement est lent. Ceci est dû à ce que l'agitation thermique restant importante, les chocs entre polynucléotides autorisent un rapprochement suffisamment fréquent des séquences complémentaires pour que les liaisons H puissent se reformer, d'abord entre C et G, ensuite entre A et T: la molécule se reconstitue alors de proche en proche; il y a **renaturation**. Cette renaturation, qui suppose que chaque polynucléotide retrouve celui qui lui est complémentaire, n'est totale que lorsque la solution de départ est formée d'un seul type de molécule de faible longueur (ADN bactérien ou viral); elle ne peut être que partielle lorsque de nombreuses molécules différentes sont mélangées (ADN obtenu à partir de cellules eucaryotes par exemple).

Lorsque le refroidissement est brutal, l'agitation thermique atteint rapidement une valeur insuffisante pour rompre les premières liaisons H formées au début de la baisse de température; celles-ci devenues stables interdisent les dissociations et réassociations successives qui sont à la base de la reconnaissance de proche en proche des segments polynucléotidiques complémentaires.

Cette expérience démontre que ***la structure en double hélice est la forme thermodynamiquement la plus stable.***

c) Les diagrammes de diffraction correspondent effectivement à la disposition en hélice de la molécule.

d) Le rapport des bases ne peut être que A/T = 1 et C/G = 1 puisque ce sont les seuls couples qu'il est possible de former entre les deux polynucléotides. On comprend également que A + T/C + G soit variable d'un ADN à l'autre, ce rapport pouvant être plus ou moins grossièrement apprécié à partir des courbes de fusion.

e) Les propriétés des bases, qui sont situées au centre de la structure en double hélices, ne peuvent qu'être masquées dans l'ADN natif.

f) L'ADN est le support de l'information génétique. Il est évident que cette molécule permet un stockage d'information, celui-ci étant matérialisé par l'ordre de succession des bases; on peut, en effet, constituer un alphabet avec quatre lettres (ici les quatre nucléotides) puisqu'on sait en former un à partir de deux signes (l'alphabet morse). L'ADN est donc une molécule informationnelle, où l'*écriture, réalisée avec un alphabet à quatre lettres, est linéaire*; elle peut être lue avec un ***code*** que nous étudierons ultérieurement.

La structure en double hélice est particulièrement intéressante pour jouer ce rôle de support matériel d'information: d'une part, les bases occupant une position interne sont protégées de l'environnement et, d'autre part, la complémentarité des deux chaînes nucléotidiques permet évidemment la reconstitution de l'une à partir de l'autre, fait particulièrement important comme nous le verrons en étudiant la duplication de l'information génétique.

1.7. L'ADN DANS LA CELLULE

Cette organisation de la molécule d'ADN décrite par WATSON et CRICK, qui leur valut un prix Nobel en 1962, est *la forme dite B.* On sait en effet maintenant qu'il en existe plusieurs autres, différentes: *la forme A* où les bases, au lieu de reposer à plat, sont inclinées par rapport à l'axe, ce qui entraîne une augmentation de leur nombre par tour; *la forme Z* qui tourne à gauche, donc en sens opposé à celui des autres formes, et qui ne possède qu'un seul sillon *(fig. VI-17).*

Il est probable que ces différentes formes coexistent dans la cellule, sans doute le long

d'une même molécule, et qu'elles interviennent comme sites de reconnaissance notamment pour les enzymes qui participent au métabolisme des acides nucléiques.

L'axe de la double hélice peut s'enrouler sur lui-même et former *une superhélice*, comme le font si aisément les fils torsadés de votre récepteur téléphonique ou une ficelle formée par plusieurs brins que vous tournez en sens opposés à chaque extrémité. *Ce surenroulement* permet de réduire le volume occupé par la molécule ; celle-ci est plus compacte. Pour être réalisé il nécessite un apport d'énergie et l'intervention d'*enzymes spécialisées* qui coupent la molécule et permettent la rotation d'un brin autour de l'autre, ce sont ***les topo-isomérases*** (voir p. 166).

Enfin, il faut avoir toujours présent à l'esprit que l'ADN n'est pas une molécule isolée, qu'elle est en règle générale associée à des protéines qui modifient très certainement sa conformation et ses propriétés.

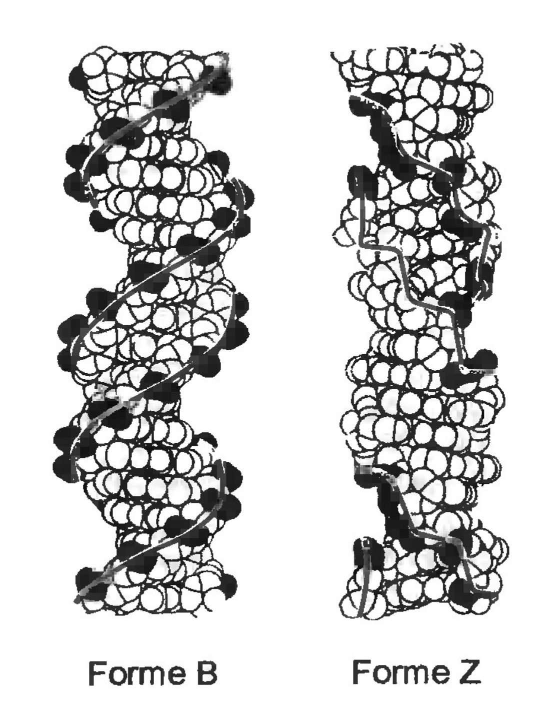


Fig. VI-17 : Deux types de double hélice d'ADN.

2. L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE OU ARN

Le second acide nucléique rencontré dans la cellule est beaucoup plus hétérogène que le précédent ; il possède une unité structurale de même type, le nucléotide, mais il s'agit là de *ribonucléotides*.

2.1. STRUCTURE DE LA MOLÉCULE D'ARN

L'hydrolyse totale de la molécule permet de retrouver les trois constituants fondamentaux des nucléotides : le phosphate, le pentose et les bases. Si on compare cette molécule à l'ADN, il y a deux différences fondamentales.

1) Le pentose est ici ***le ribose*** *(fig. VI-18)* ; les nucléotides de l'ARN seront donc des *ribonucléotides* ; ce sucre porte en position 2' un OH, groupement très réactif, **qui confère à l'ARN une stabilité moins grande que celle de l'ADN.**

2) La thymine n'existe que très occasionnellement dans l'ARN ; elle est presque toujours remplacée par une autre base qui, elle, ne se rencontre pas dans l'ADN, *l'uracile (fig. VI-18)*. Le nucléoside constitué avec cette base est ***l'uridine***.

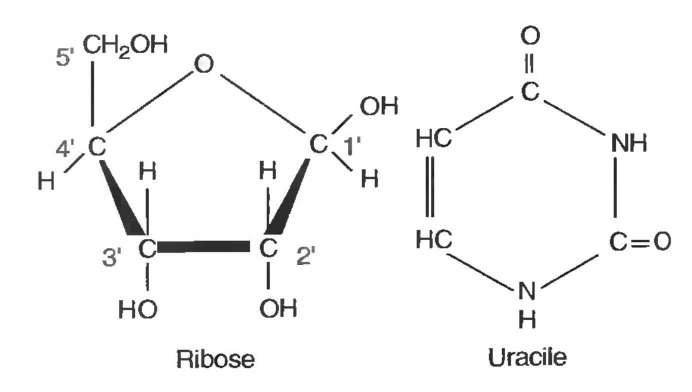


Fig. VI-18 : Les deux constituants propres à la molécule d'ARN.

On distingue donc 4 ribonucléotides entrant dans la constitution de l'ARN :
deux ribonucléotides pyrimidiques :
cytidine monophosphate,
uridine monophosphate.
deux ribonucléotides puriques :
adénosine monophosphate,
guanosine monophosphate.

La structure primaire de la molécule est donc un *polynucléotide* qui présentera des propriétés comparables à celles de l'ADN : forte absorption dans l'ultraviolet due aux bases azotées ; molécules très longues, orientées avec une extrémité 5'phosphate et une autre 3'OH ; une séquence correspondant à l'ordre de succession des bases, susceptible de porter une information.

La différence essentielle tient au fait que l'ARN est toujours constitué par *un seul polynucléotide, la molécule est* ***monocaténaire***.

Ceci n'interdit pas la réalisation d'une structure secondaire ; simplement celle-ci s'établit par *reploiement de l'unique chaîne polynucléotidique*. Les bases sont appariées de la même manière que dans l'ADN, la thymine étant remplacée par l'uracile. Entre la guanine et la cytosine il y a également trois liaisons H, et seulement deux entre l'uracile et l'adénine. Il en résulte que sur une ou plusieurs parties de leur longueur, les ARN adoptent une configuration en hélice ; celle-ci n'intéresse pas toute la molécule, la totale complémentarité des bases n'y existant pas.

2.2. LES DIFFÉRENTS TYPES D'ARN

Ce sont des molécules souvent volumineuses qui, selon leur rôle biologique, se répartissent entre trois familles principales dont nous aurons l'occasion de reparler dans d'autres parties du volume.

A. Les ARN messagers ou ARNm

Ces ARN sont les *intermédiaires entre le noyau et le cytoplasme*, ils permettent le transfert de l'information du territoire nucléaire où elle est stockée au niveau de l'ADN, vers le cytosol où les protéines sont synthétisées. (voir 2e partie, chap. III).

Conséquence de ce rôle, le nombre de nucléotides et leur ordre d'enchaînement dépendent de l'information transportée ; celle-ci variant d'un ARNm à l'autre, *ils forment une population très hétérogène*, les masses moléculaires étant fort variables. Leur nombre dans la cellule change avec l'activité, le type cellulaire, la période du cycle cellulaire. Bien que leur durée de vie soit souvent très brève, il y a plusieurs dizaines de milliers de molécules d'ARNm présentes simultanément dans une cellule eucaryote car elles sont constamment renouvelées. Malgré leur très grande variété, ces molécules ne représentent que 5 % environ de l'ARN cellulaire total.

B. Les ARN de transfert ou ARNt

Ce sont de petits ARN de 75 à 90 nucléotides dont il existe environ une cinquantaine de types différents dans une cellule. Ils ont une forme caractéristique, dite en trèfle (voir 2e partie, chap. IV consacré à la synthèse des protéines) ; ils fixent un acide aminé et reconnaissent la position qu'il doit occuper dans le polypeptide en cours d'élaboration car ils sont capables d'identifier une séquence de 3 bases (le codon) sur l'ARNm : ce sont des *adaptateurs*.

Leur durée de vie est longue et ils ne représentent que 10 à 15 % de l'ARN total.

C. Les ARN ribosomaux ou ARNr

Ils représentent entre 75 et 80 % de l'ARN cellulaire. Ce sont des polynucléotides de taille importante, monocaténaires mais qui adoptent partiellement une structure secondaire en hélice par reploiement de la molécule.

Associés à des protéines ils sont les *constituants essentiels des ribosomes*. Il en existe plusieurs que l'on caractérise par leur *coefficient de sédimentation (s)*. Pour déterminer celui-ci, on met les particules (ARN ou organites, car c'est une méthode générale applicable également aux différentes macromolécules) en suspension dans un milieu de densité connue, et on leur applique une accélération

atteignant 100 000 fois celle de la pesanteur (100 000 g) produite par une centrifugeuse tournant à une vitesse élevée, de l'ordre de 60 000 tours/minute ; l'étude du déplacement des particules soumises à ces conditions expérimentales permet de déterminer un coefficient de sédimentation qui s'exprime en unités Svedberg (S), en hommage au chercheur qui a mis au point la méthode. Ce coefficient de sédimentation est bien entendu *fonction de la masse moléculaire de la particule, mais aussi de sa conformation spatiale*, c'est-à-dire de la résistance qu'elle offre au déplacement.

Les ribosomes des Eucaryotes *(fig. VI-19)*, dont le coefficient de sédimentation est de 80S, contiennent 4 ARNr différents :

– un ARN 28S (4 700 nucléotides), un ARN 5S (120 nucléotides) et un ARN 5,8S (160 nucléotides) qui, associés à 50 protéines, forment la grosse sous-unité du ribosome (60S) ;

– un ARN 18S (1 900 nucléotides) qui avec 33 protéines environ forme la petite sous-unité du ribosome (40S).

Les ribosomes des Procaryotes (70S) ont une composition légèrement différente : une grosse sous-unité (50S) formée par l'association d'un ARN 23S (2 900 nucléotides), d'un ARN 5S (120 nucléotides) et de 31 protéines ; une petite sous-unité (30S) constituée d'un ARN 16S (1 540 nucléotides) et de 21 protéines.

Noter que la constante de sédimentation d'un ribosome n'est pas la somme de celles de ses constituants ; ceci tient au fait que la valeur de S n'est pas seulement fonction de la masse moléculaire, mais aussi de la forme, de la rigidité de la molécule, c'est-à-dire, comme cela a été dit précédemment, de sa résistance au déplacement dans le milieu.

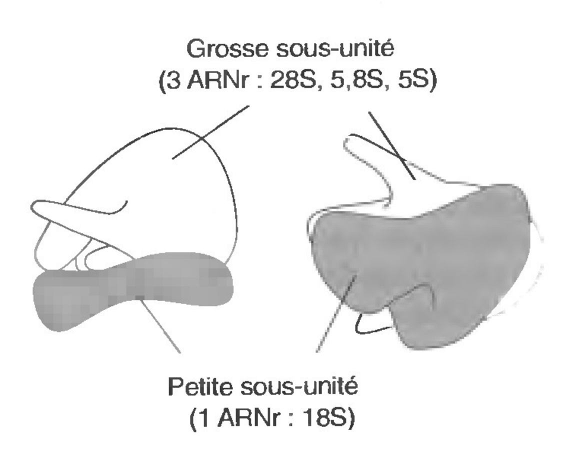


Fig. VI-19 : Ribosome de cellule eucaryote observé sous deux angles différents.

2.3. MISE EN ÉVIDENCE DES ARN DANS LA CELLULE

La méthode utilisée pour mettre en évidence l'ARN dans la cellule est une méthode de coloration par *le vert de méthyle et la pyronine* (mélange dit de Unna).

Lorsqu'une coupe de matériel biologique est traitée par cette solution, les territoires cellulaires riches en ARN (cytoplasme riche en ribosomes et nucléole) sont colorés en rose par la pyronine alors que les zones riches en ADN (chromatine) fixent le vert de méthyle.

Cette coloration est *élective et non spécifique* ; d'autres structures peuvent se colorer par la pyronine. Pour vérifier la nature réellement ribonucléoprotéique des particules, on effectue un test faisant appel à la *spécificité enzymatique de la ribonucléase*.

Pratiquement, deux coupes du matériel sont traitées parallèlement, l'une par une solution tamponnée de ribonucléase (coupe n° 1), l'autre par la solution tamponnée sans ribonucléase (coupe n° 2). Les deux coupes sont ensuite colorées simultanément par le mélange de vert de méthyle et de pyronine. Pour affirmer qu'une structure colorée en rose dans la coupe n° 2 est bien riche en ARN, il est indispensable qu'elle ait disparu (détruite par l'enzyme) sur la coupe n° 1. *C'est la spécificité de l'action enzymatique qui est ici utilisée pour caractériser la macromolécule.* Cette méthode constitue le test de BRACHET, du nom du savant belge qui l'a mise au point.

Il faut noter que cette méthode, utilisable en microscopie photonique uniquement, ne permet de mettre en évidence que les accumulations relativement importantes de ribonucléoprotéines (RNP) ; les ARNt, les ARNm ne peuvent pas être détectés *in situ* par cette technique.

En dehors des acides nucléiques, les nucléotides, ou leurs dérivés, interviennent dans de nombreuses réactions biochimiques. Nous en retiendrons deux exemples.

3. LES DÉRIVÉS DE NUCLÉOTIDES

3.1. LES NUCLÉOSIDES 5' POLYPHOSPHATES

Ce sont des composés phosphorylés construits à partir de nucléosides 5' monophosphate par addition de nouveaux groupements phosphorylés; cette addition s'effectue par une liaison anhydride d'acide symbolisée ~, pour bien la distinguer des autres; en effet lorsqu'elle est hydrolysée, cette liaison libère une quantité d'énergie libre relativement élevée (7,3 Kcalories).

À partir de l'adénosine monophosphate ou AMP, on obtient, par addition d'un phosphoryle, l'adénosine diphosphate ou ADP, qui se transforme en adénosine triphosphate ou ATP par adjonction d'un nouveau phosphoryle *(fig. VI-20)*.

Ces trois molécules sont interconvertibles:

$ATP + H_2O \rightarrow ADP + Pi + H^+ + 7{,}3$ Kcal
où Pi est un phosphate inorganique

$ATP + H_2O \rightarrow AMP + PPi + H^+ + 7{,}3$ Kcal
où PPi est un groupe pyrophosphate

ou bien ATP + AMP → ADP + ADP.

La transformation réversible
$ADP + Pi \rightarrow ATP + H_2O$ est le moyen utilisé dans les cellules pour assurer les transferts d'énergie.

L'ATP est formé à partir d'ADP et de Pi lorsque des molécules sont oxydées; par exemple la réaction dans la glycolyse (voir p. 320)

glycéraldéhyde-phosphate → phosphoglycérate

qui libère 11,8 Kcal est une réaction exergonique qui peut être couplée à la formation d'ATP qui nécessite 7,3 Kcal. La perte globale d'énergie est alors seulement de $11{,}8 - 7{,}3 = 4{,}5$ Kcal.

Par ailleurs, la synthèse d'autres molécules demande un apport énergétique, ce sont les réactions endergoniques; ainsi la synthèse de glutamine:

acide glutamique+ NH_3+ 3,4 Kcal → glutamine

Cette énergie peut être fournie par l'hydrolyse de l'ATP; la perte d'énergie est alors de $7{,}3 - 3{,}4 = 3{,}9$ Kcal.

Dans un cas comme dans l'autre, réactions de synthèse ou *anaboliques*, de dégradation ou *cataboliques*, s'accompagnent d'une perte d'énergie. Celle-ci doit être compensée, soit par oxydation de matières organiques externes, comme le font les *hétérototrophes*, soit par récupération de l'énergie accumulée dans les liaisons chimiques minérales (*chimioautotrophes*) ou celle transportée par les photons (*photoautotrophes*). Ces derniers, à

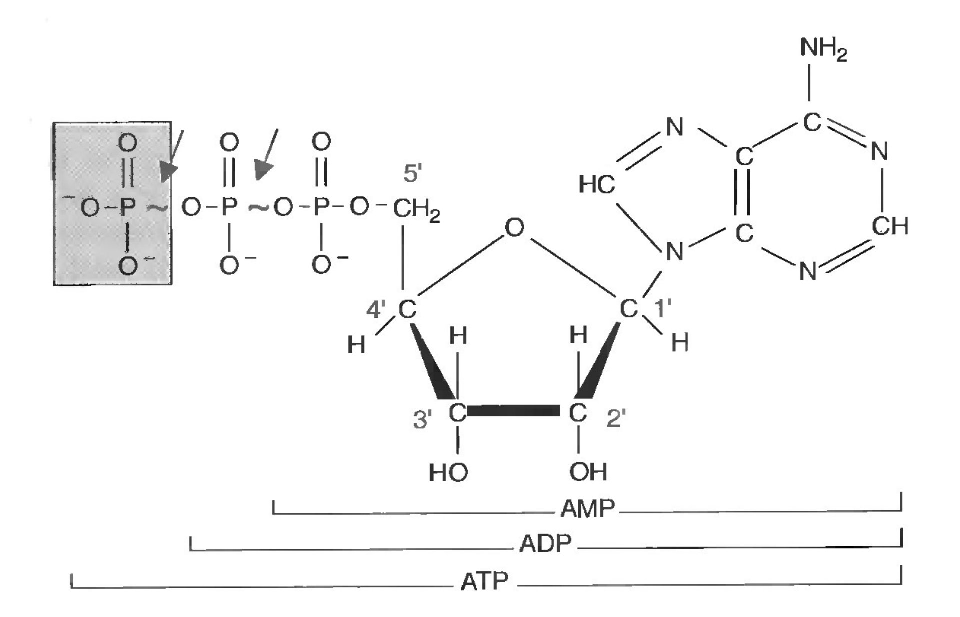


Fig. VI-20 : Nucléosides 5'polyphosphates.
Le groupe phosphate terminal (encadré) est enzymatiquement transféré à des accepteurs.

l'origine de pratiquement toute l'énergie utilisée par les organismes vivants, sont ***les producteurs primaires***.

L'ATP n'est donc pas une forme de réserve de l'énergie dans la cellule, c'est un intermédiaire. Les molécules d'ATP sont toujours utilisées dans la minute qui suit leur formation: le *turn over* de l'ATP est très rapide, c'est-à-dire que cette molécule est en perpétuel renouvellement, son remplacement est extrêmement rapide. Dans une bactérie par exemple, le nombre de molécules nécessaires pour effectuer les synthèses est de 2000000 par seconde environ; or on estime à 1000000 le nombre de molécules d'ATP contenu dans une cellule.

3.2. LES NUCLÉOSIDES 3'-5' MONOPHOSPHATE CYCLIQUES

Ce sont des nucléosides dans lesquels une seconde liaison ester s'établit entre le phosphoryle lié en 5' et un autre hydroxyle du pentose, le 3' *(fig. VI-21)*.

Le plus important est l'adénosine monophosphate cyclique ou AMP cyclique qui est une molécule capable de modifier la vitesse des réactions biologiques; elle est synthétisée par l'adénylate-cyclase, enzyme contenue dans la membrane plasmique qui est activée (c'est-à-dire qui entre en action) par une hormone.

Fig. VI-21 : AMP cyclique.

CONCLUSION

Les acides nucléiques sont des macromolécules constituées par un enchaînement de nucléotides : c'est la structure primaire. L'ordre de succession des 4 nucléotides constitutifs, dans le sens 5' vers 3', constitue ***la séquence***; comme celle-ci diffère d'une molécule à l'autre, les acides nucléiques sont des ***molécules informationnelles***.

Ces molécules sont un exemple remarquable de ***relation structure-fonction*** puisqu'elles sont formées par *un squelette pentoses-phosphates* portant latéralement les bases, ce qui permet, d'une part *la lecture de l'information*, d'autre part, en raison des possibilités limitées de liaisons entre ces bases, *l'élaboration d'une molécule complémentaire* qui autorise le transfert à une autre molécule du message transporté.

Seconde partie

LES COMPARTIMENTS CELLULAIRES ET LEURS FONCTIONS

Posté par Boyaya



CHAPITRE I

La membrane plasmique

Une caractéristique de toutes les cellules est la présence de membranes qui délimitent la cellule et éventuellement les compartiments cellulaires qu'elle contient (dans le cas des Eucaryotes). Les membranes biologiques, on le verra, ont de multiples fonctions : définir, compartimenter et maintenir l'intégrité de la cellule, contrôler les mouvements – entrée et sortie – de substances dans la cellule et ses compartiments, détecter et reconnaître les signaux extérieurs, servir de lieu pour des fonctions spécifiques...

Ce chapitre sera essentiellement consacré à la **membrane plasmique** (ou **plasmalemme**, du grec *plasma*, chose façonnée, et *lemma*, coque), c'est-à-dire la membrane qui constitue autour de la cellule une enveloppe, mince et continue, séparant le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. Les propriétés et fonctions des membranes des compartiments internes et des organites semi-autonomes seront envisagées dans les chapitres suivants.

1. ASPECTS MORPHOLOGIQUES

Au microscope optique, la membrane plasmique est repérable dans la mesure où elle délimite les cellules, mais sa morphologie ne peut être connue en raison des limites de la résolution. C'est le microscope électronique qui permet d'en définir les caractéristiques. Avec les méthodes de routine (fixation au glutaraldéhyde et au tétroxyde d'osmium, contraste avec les sels d'uranyle et de plomb) la membrane a une apparence tripartite comme des rails de chemin de fer *(fig. I-1, A)*. Son épaisseur moyenne est de 8,5 nm. Elle comprend trois feuillets : deux feuillets denses aux électrons de 2,5 nm d'épaisseur séparés par un feuillet transparent aux électrons de 3,5 nm d'épaisseur *(fig. I-1, B)*.

En fait, la membrane plasmique présente souvent une asymétrie de structure, la face extracytoplasmique étant généralement recouverte d'un revêtement fibrillaire dont l'épaisseur peut varier : habituellement il forme un duvet presque imperceptible de 5 à 10 nm d'épaisseur, mais dans certains cas il peut atteindre 50 à 200 nm (dans des cellules épithéliales de l'intestin par exemple). C'est le **revêtement fibreux** (*cell-coat* des Anglo-Saxons) qui constitue un véritable microenvironnement pour la cellule et joue un rôle important dans la reconnaissance cellulaire. Après contraste des polysaccharides, par exemple avec le test cytochimique PATAg (voir chap. V, 1re partie), ce revêtement

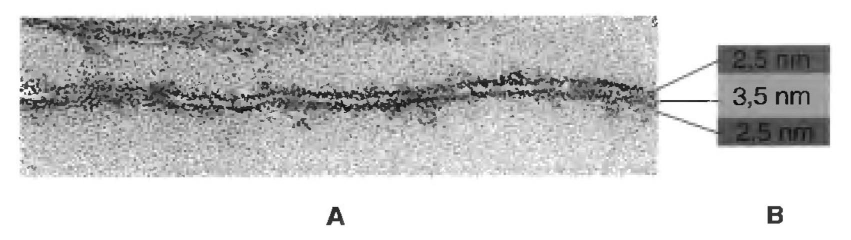


Fig. I-1 : La membrane tripartite.
A) Au microscope électronique à transmission après contraste selon les méthodes conventionnelles (osmium, sels d'uranyle et de plomb). (G. x 80 000)
(Cliché B. VIAN.)
B) Schéma d'interprétation.

apparaît réactif. Il comprend donc une composante glucidique ce qui explique le nom de **glycocalyx** (du grec *glukus*, doux, sucré, et *kalux*, enveloppe) qui lui est souvent donné.

2. COMPOSITION CHIMIQUE

Comme pour tous les organites cellulaires, l'analyse chimique implique au préalable de pouvoir isoler une fraction de membrane plasmique la plus pure possible.

2.1. LES TECHNIQUES D'ISOLEMENT

Il est relativement difficile d'obtenir une fraction de membrane plasmique dépourvue d'autres contaminants membranaires. Nous ne rentrerons pas ici dans le détail des techniques d'isolement et de purification qui sont souvent complexes. En revanche nous décrirons les étapes d'isolement de membrane plasmique d'hématies qui constituent un matériel particulièrement favorable. Les hématies, ou globules rouges, de mammifères sont en effet des cellules anucléées et dépourvues de membranes internes lorsqu'elles ont atteint l'état mature. À partir d'une grande quantité de globules rouges il est donc possible de récupérer une fraction de membrane plasmique pratiquement pure *(fig. I-2)*.

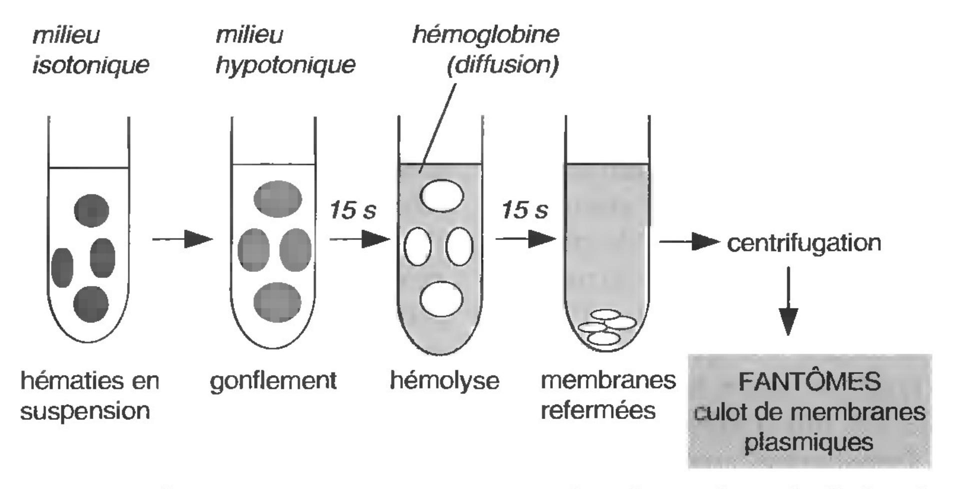


Fig. I-2 : Isolement de « fantômes », culots de membranes plasmiques, à partir d'hématies de mammifère.

Les hématies sont dans un premier temps séparées du sérum par centrifugation de façon à éviter une contamination par les protéines de ce sérum. Elles sont recueillies dans un milieu physiologique le plus isotonique possible par rapport au sérum (on utilise généralement du NaCl à 0,9 %).

Les hématies sont ensuite traitées par un choc osmotique (transfert dans un milieu plus dilué, c'est-à-dire hypotonique) qui a pour effet de faire gonfler les cellules et de provoquer une **hémolyse**, c'est-à-dire une diffusion du contenu cellulaire et en particulier de l'hémoglobine hors des cellules. Après hémolyse les membranes se referment et sont récupérées par centrifugation. On recueille alors des **fractions très enrichies en membranes plasmiques**, sortes de cellules dépourvues de tout contenu : ce sont de véritables **fantômes** cellulaires.

2.2. ANALYSE CHIMIQUE

La membrane plasmique du globule rouge est un agrégat lipo-protéique qui comprend en moyenne 40 % de lipides et 60 % de protéines, dont beaucoup sont des glycoprotéines et des glycolipides.

Les lipides constituent l'élément architectural de la membrane, sa matrice. Il est aisé de s'en apercevoir en faisant agir sur la membrane, soit des détergents, soit des enzymes de type lipase : dans les deux cas la membrane s'effondre totalement.

Les lipides rencontrés dans la membrane sont principalement :

– des **phospholipides,** de loin les plus nombreux. Ils comportent une tête phosphorylée hydrophile et une queue formée de deux chaînes aliphatiques d'acides gras saturés ou non : ce sont donc des molécules **amphiphiles** ou **amphipathiques** (voir chap. IV, 1re partie pour tous les détails concernant la structure des lipides) ;

– du **cholestérol**, un lipide de type stéroïde, dont la quantité a une influence sur la rigidité des membranes et leur stabilité mécanique ; en comparaison avec les autres membranes biologiques le cholestérol est particulièrement abondant dans la membrane plasmique (30 à 50 % des lipides) mais est absent chez la plupart des Procaryotes ;

– des **glycolipides**, lipides dont l'antenne oligosaccharidique est orientée vers le milieu extracellulaire.

Les protéines de la membrane plasmique sont nombreuses et très diversifiées, donc beaucoup plus difficiles à isoler et à caractériser que les lipides. Une des caractéristiques des protéines liées à la membrane plasmique est de posséder un ou plusieurs **domaines hydrophobes** qui seront en contact avec les lipides, et un ou plusieurs **domaines hydrophiles** qui seront en contact avec les régions riches en eau de l'environnement cellulaire (cytosol, milieu extracellulaire) *(fig. I-3)*. Les protéines de la membrane sont des **protéines amphiphiles**.

En plus d'un rôle structural, il sera vu plus loin que ces protéines ont des fonctions extrêmement variées : elles peuvent être des enzymes, des transporteurs (pour les ions par exemple), des perméases, des récepteurs pour les hormones, des antigènes (histocompatibilité, groupes sanguins...).

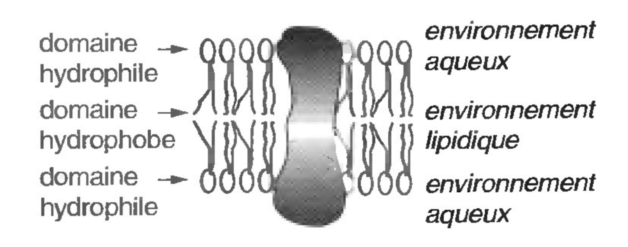


Fig. I-3 : Représentation schématique d'une protéine membranaire amphiphile.

3. ARCHITECTURE MOLÉCULAIRE

Sur le plan historique, l'étude des membranes biologiques, et de la membrane plasmique en particulier, est très intéressante car elle est jalonnée de propositions de modèles fondés sur des approches très variées et complémentaires. Nous en retracerons ici seulement les étapes les plus notables *(fig. I-4)*.

3.1. LES PREMIERS MODÈLES MEMBRANAIRES

Les premières études sur les membranes ont été souvent indirectes. Dès 1890, OVERTON observait que les cellules sont entourées d'une enveloppe laissant passer sélectivement certaines substances (surtout les substances lipophiles) et en retenant d'autres. Il proposait l'hypothèse que les membranes biologiques sont constituées de mixtures de lécithines et de cholestérol.

Au début du siècle, LANGMUIR, un chimiste des lipides, obtenait les premiers étalements à la surface de l'eau de phosphoaminolipides dissous dans le benzène. Les molécules se rapprochaient et s'orientaient spontanément; leurs extrémités hydrophiles étaient au contact de l'eau et leurs extrémités hydrophobes à l'opposé dans le benzène. Quand le benzène s'évaporait les molécules formaient **une couche monomoléculaire** à la surface de l'eau, leurs queues hydrophobes étant orientées verticalement dans l'air.

GORTER et GRENDEL, en 1925 ont réalisé les premières **membranes artificielles**. Après avoir extrait les lipides de la membrane des globules rouges ils réalisaient un étalement monomoléculaire à la surface de l'eau selon la méthode de Langmuir. Il apparut ainsi que la surface réelle de la cellule correspondait à la moitié de la surface des étalements. L'hypothèse fut alors que les membranes biologiques étaient formées par une **double couche lipidique**, hypothèse confirmée par l'analyse du comportement spontané des phospholipides et des glycolipides en milieu aqueux (voir chap. IV, 1re partie).

En 1935 DAVSON et DANIELLI, essayant d'intégrer les protéines caractérisées par les analyses, proposaient un modèle dans lequel les protéines sont associées aux pôles hydrophiles des lipides. C'est ce modèle qui fut longtemps retenu car il coïncidait avec les premières images des membranes tripartites obtenues en microscopie électronique. Ainsi dans les années 60 le concept de **membrane unitaire tripartite**, proposé par ROBERTSON (*unit membrane* des Anglo-Saxons), semblait un modèle universel pour les membranes biologiques. Toutefois la perméabilité des substances hydrosolubles avec un tel modèle restait une énigme pour les physiologistes.

3.2. LE MODÈLE EN MOSAÏQUE FLUIDE

C'est un modèle qui a été proposé en 1972 par SINGER et NICOLSON. Il repose sur différents types d'expériences dont le but était de localiser les protéines dans l'édifice membranaire.

A. *Localisation des protéines par marquage à l'iode radioactif*

Le principe est de marquer les protéines par ^{125}I. En fait on marque les résidus Tyr et His des chaînes polypeptidiques par l'intermédiaire d'une enzyme, la lactoperoxydase, selon la réaction :

$$^{125}I + \text{H-Tyr} \xrightarrow[\text{lactoperoxydase}]{H_2O_2} {}^{125}I\text{-Tyr} + H_2O + OH^-$$

L'enzyme est une grosse molécule qui ne peut traverser la membrane et pénétrer dans la cellule, de sorte que seules les protéines qui affleurent peuvent être marquées.

L'expérience peut être effectuée sur des fantômes d'hématies *(fig. I-5)* :

– dans un premier temps les hématies sont marquées par ^{125}I en présence de H_2O_2 et de

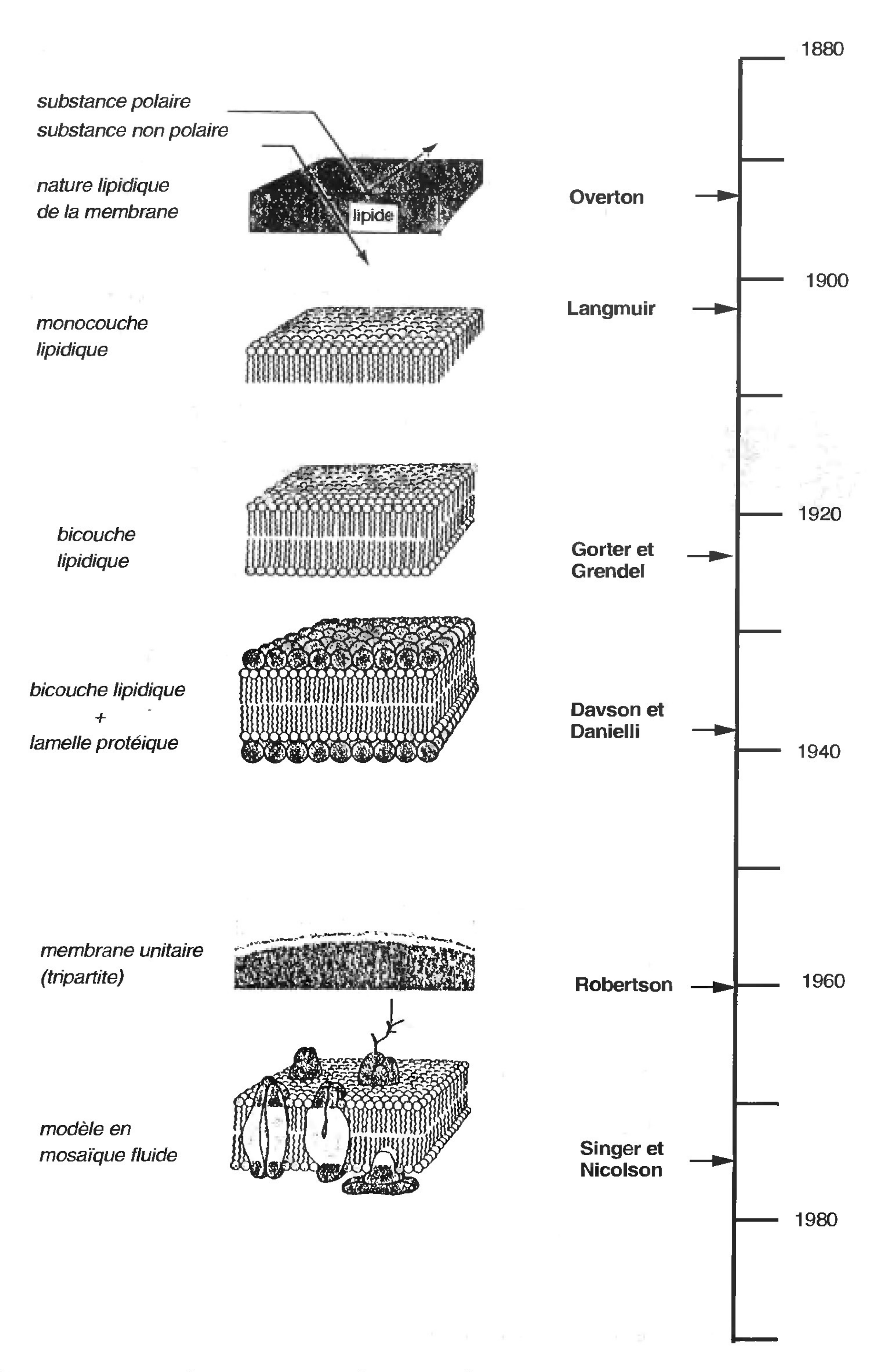


Fig. I-4 : Chronologie de la découverte des différents modèles de membranes.
(D'après W.M. BECKER. The world of the cell. 1986.)

lactoperoxydase. Les cellules subissent alors un choc osmotique et après hémolyse on recueille des fantômes dont les protéines qui affleurent sont marquées ;

– les membranes subissent l'action d'un détergent, par exemple le SDS, sodium dodécyl phosphate, chargé négativement. Le détergent solubilise les lipides et se fixe sur les protéines en les dénaturant et en les chargeant ;

– par électrophorèse on sépare les protéines et une autoradiographie des électrophorégrammes permet de repérer quelles sont les protéines radioactives.

Cette expérience indique la *quantité et le poids moléculaire des protéines qui affleurent à la surface des membranes plasmiques de l'hématie.*

La question est de savoir si des protéines affleurent aussi à la surface interne de la mem-

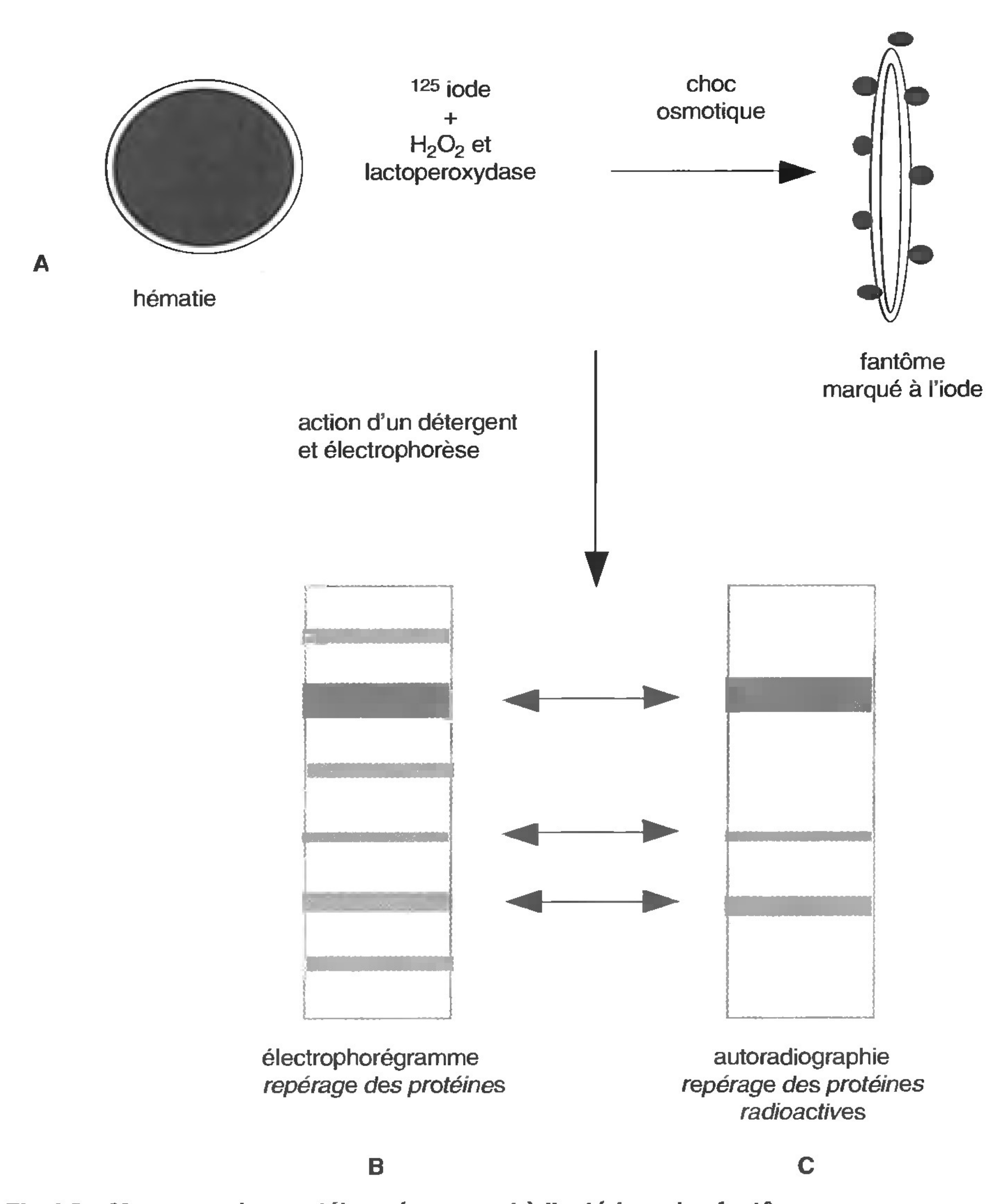


Fig. I-5 : Marquage des protéines émergeant à l'extérieur des fantômes.
A) Marquage des fantômes par l'iode radioactif.
B) Repérage des protéines sur gel d'électrophorèse par coloration (bleu de Coomassie).
C) Repérage des protéines qui affleurent par autoradiographie sur gel.

brane plasmique, au contact avec le hyaloplasme. La même expérience peut alors être réalisée sur des *membranes retournées* obtenues par traitement à pH alcalin et sous agitation de fantômes d'hématies. En comparant, après autoradiographie, les électrophorégrammes des hématies entières et des membranes retournées on peut établir une véritable « *carte topographique* » de la répartition des protéines dans les membranes. Il apparaît en particulier que de très nombreuses protéines affleurent sur les deux faces de la membrane et sont donc des ***protéines transmembranaires***.

B. *Interprétation des répliques après cryofracture*

La technique de cryofracture a aussi largement contribué à l'exploration de l'architecture des membranes. Les principales étapes de cette méthode sont les suivantes *(fig. I-6)*:

– le matériel biologique (fragments de tissus, cellules, ou fractions d'organites) est congelé de façon ultrarapide à très basse température (de l'ordre de – 196 °C, dans l'azote liquide, ou dans du fréon ou du propane refroidis par l'azote liquide) (étape A);

– portés dans une enceinte où règne un grand vide les échantillons maintenus congelés sont cassés mécaniquement par un rasoir lui-même refroidi (étape B); une étape de décapage – sublimation sous vide d'une couche de glace de surface – peut alors être effectuée (étape C). Cette étape est facultative;

– un film métallique (platine, or, ou tungstène) est vaporisé et projeté sur la surface sous un angle de 45 ° environ (étape D);

– une couche de carbone est alors vaporisée verticalement de façon à former un film continu en surface qui consolidera le dépôt de platine (étape E);

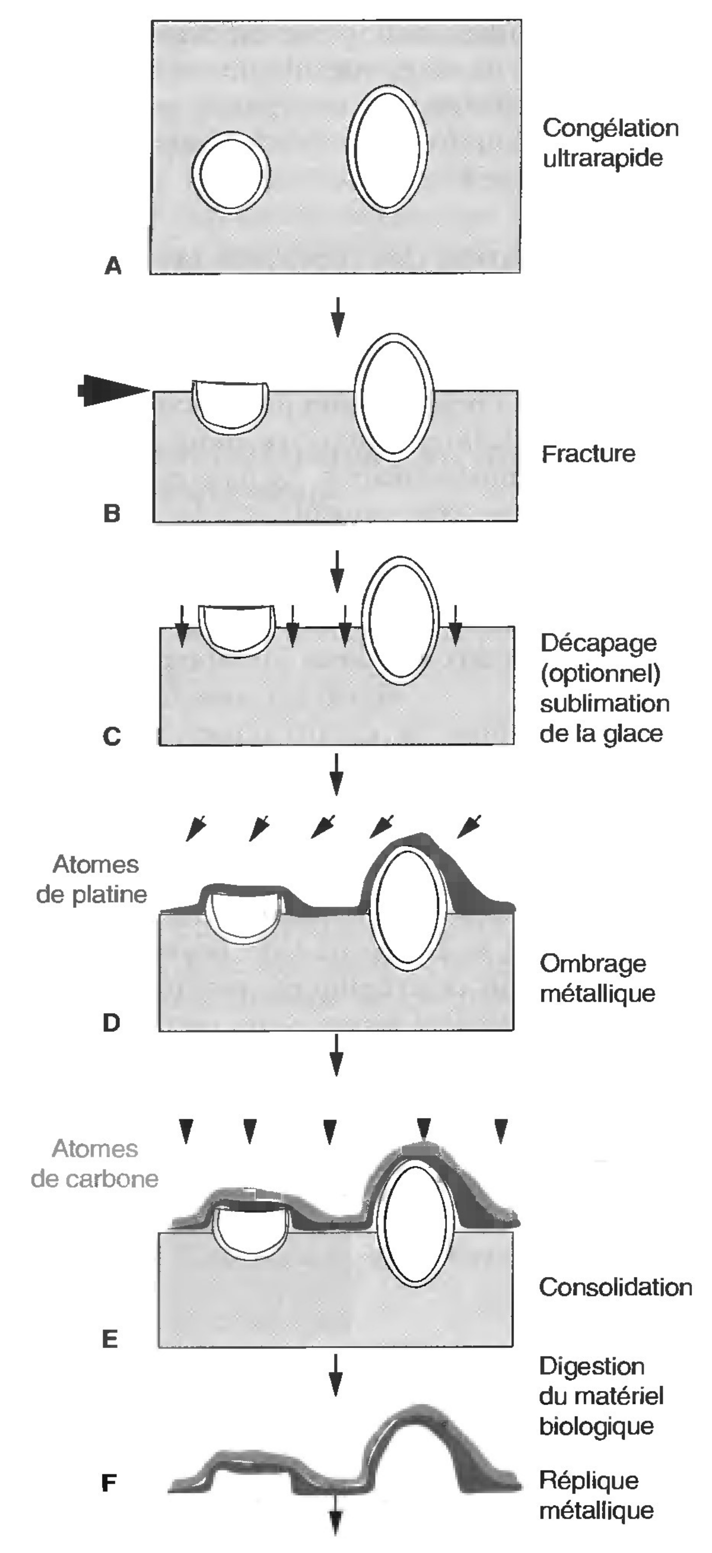


Fig. I-6 : La technique de cryofracture.
A) Congélation ultrarapide des cellules.
B) Fracture à l'aide d'une lame de rasoir maintenue à basse température. La flèche indique le plan de clivage.
C) Décapage par sublimation d'une partie de la glace en surface. Le niveau est légèrement abaissé. Cette étape est facultative.
D) Ombrage métallique sous un angle voisin de 45°. Le métal se répartit inégalement selon les reliefs.
E) Vaporisation de carbone pour former un film continu.
F) Récupération de la réplique métallique (l'objet biologique est digéré) pour observation au microscope électronique à transmission.

– l'échantillon biologique est digéré totalement et son moulage métallique est récupéré, lavé et recueilli sur une grille pour être observé au microscope électronique à transmission (étape F).

L'observation des répliques montre des images avec impression de relief ; la fracture intervenant entre les deux feuillets lipidiques, c'est-à-dire les zones de moindre résistance, ouvre la membrane en son milieu comme une fermeture éclair, et expose deux faces de fracture complémentaires, la *face de fracture cytoplasmique,* côté cytosol, et la *face de fracture exoplasmique*, côté extérieur. Sur ces faces de fracture on voit des particules dont des observations ont pu montrer qu'elles correspondaient aux protéines intramembranaires *(fig. I-7).*

La technique de cryofracture a pu être utilisée aussi sur des membranes artificielles (ou des liposomes) de façon à préciser l'architecture moléculaire des membranes *(fig. I-8)*:

– un mélange de phospholipides seuls est traité selon la technique de cryofracture. L'observation des répliques montre des surfaces parfaitement lisses, sans particules : le plan de clivage est passé au milieu de la bicouche lipidique ;



Fig. I-7 : Face de fracture exoplasmique (hémimembrane externe) d'une membrane plasmique de cellule végétale (racine de pois).
La flèche indique la direction de l'ombrage.
(Cliché B. VIAN.)

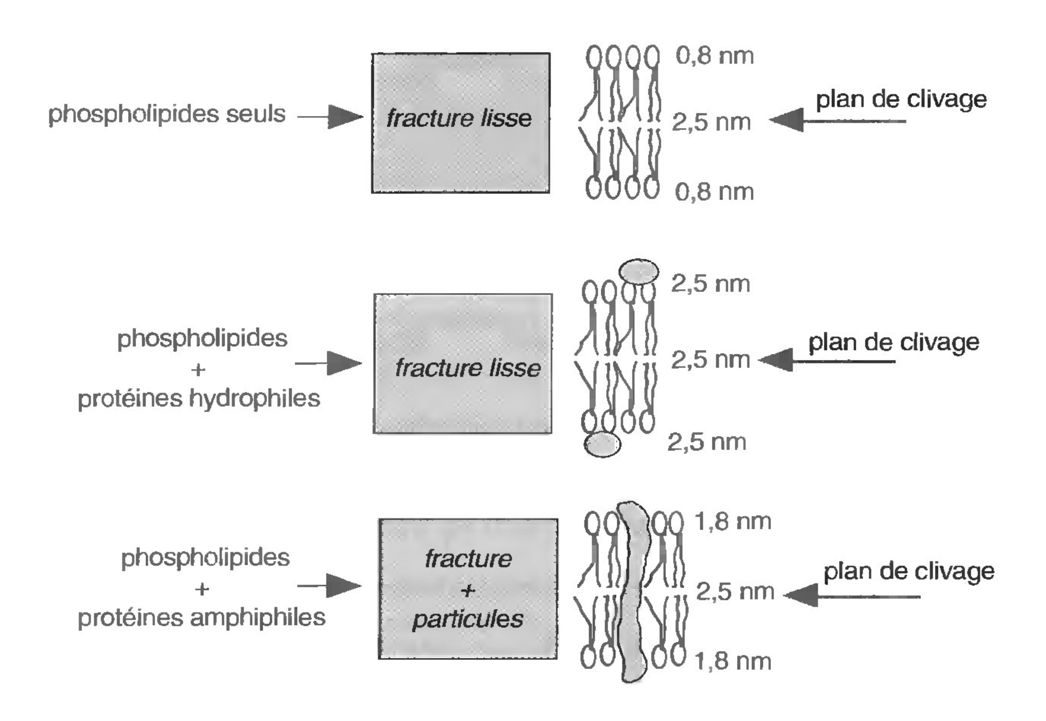


Fig. I-8 : Cryofracture de liposomes de composition différente.
Seule la membrane artificielle faite de phospholipides et de protéines amphiphiles présente des particules après cryofracture. Notez également les différences d'épaisseurs telles qu'elles peuvent être mesurées lorsque les liposomes ont été débités en coupes ultrafines, observées au microscope électronique.

– un mélange de phospholipides et de petites protéines hydrophiles est traité par la même méthode. L'observation des répliques montre là encore des surfaces parfaitement lisses, sans particules : les protéines n'apparaissent pas après clivage médian de la bicouche lipidique et sont donc localisées à l'extérieur de celle-ci ;

– un mélange de phospholipides et de protéines présentant des domaines hydrophobes est traité par la même méthode. L'observation des répliques montre des surfaces couvertes de particules : les protéines apparaissent après clivage de la bicouche ce qui indique qu'elles sont intégrées à l'intérieur de celle-ci.

C. Description du modèle

La *figure I-9* résume les principaux aspects de ce modèle membranaire. Les lipides sont organisés en une bicouche faite de phospholipides et de cholestérol, dans laquelle les protéines flottent telles des icebergs dans une mer d'huile.

Beaucoup de protéines traversent la bicouche lipidique et sont des **protéines transmembranaires**. Ce sont des protéines amphiphiles et il apparaît que souvent elles traversent la bicouche lipidique en formant une ou plusieurs hélices α. Ces protéines sont difficiles à dissocier de la membrane, la dissociation ne pouvant se faire qu'à l'aide de détergents. On parle de *protéines intégrées*. D'autres protéines n'entrent pas en contact avec la région hydrophobe de la membrane : ce sont des **protéines périphériques**, fixées indirectement à la membrane par des interactions avec les protéines transmembranaires. Elles sont facilement détachables car les liaisons qui les maintiennent sont faibles. La *figure I-10* résume quelques modes d'association que peuvent établir les protéines membranaires avec la bicouche lipidique.

D. Caractéristiques du modèle en mosaïque

Deux caractéristiques principales peuvent être dégagées des observations et des expériences concernant la membrane plasmique.

• **La membrane est fluide**

C'est une réponse à la question : y a-t-il un déplacement des protéines dans le plan latéral de la membrane ou même d'une couche à l'autre (flip-flop) ?

Une expérience classique permet de répondre partiellement à cette question *(fig. I-11)*. Elle est fondée sur le marquage immunocytochimique de composés de surfaces et sur la possibilité de fusions cellulaires :

– à partir de cellules humaines en culture on prépare des anticorps AC1 dirigés contre des glycoprotéines de surface ; ces anticorps sont marqués à la fluorescéine ; lorsque les

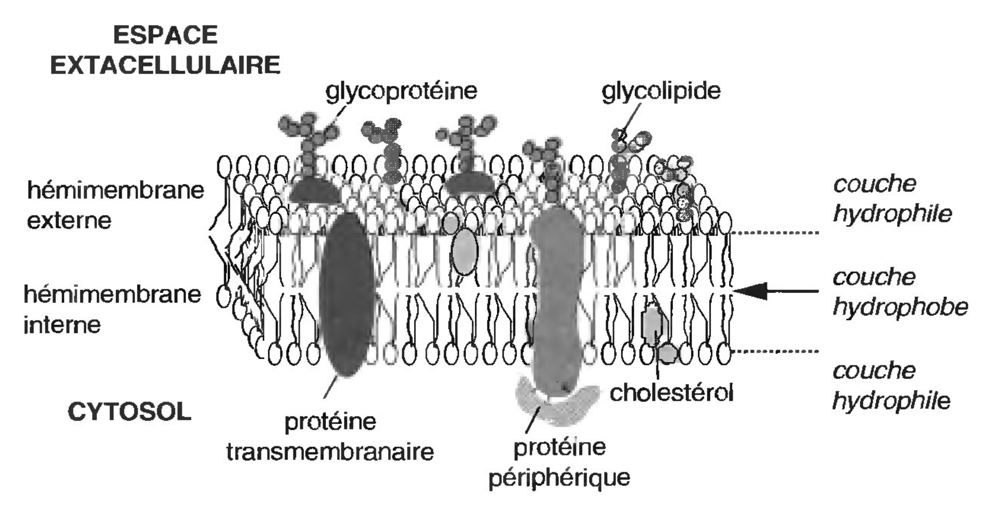


Fig. I-9 : Modèle de membrane plasmique en mosaïque fluide.
La flèche indique le plan de clivage en cryofracture.

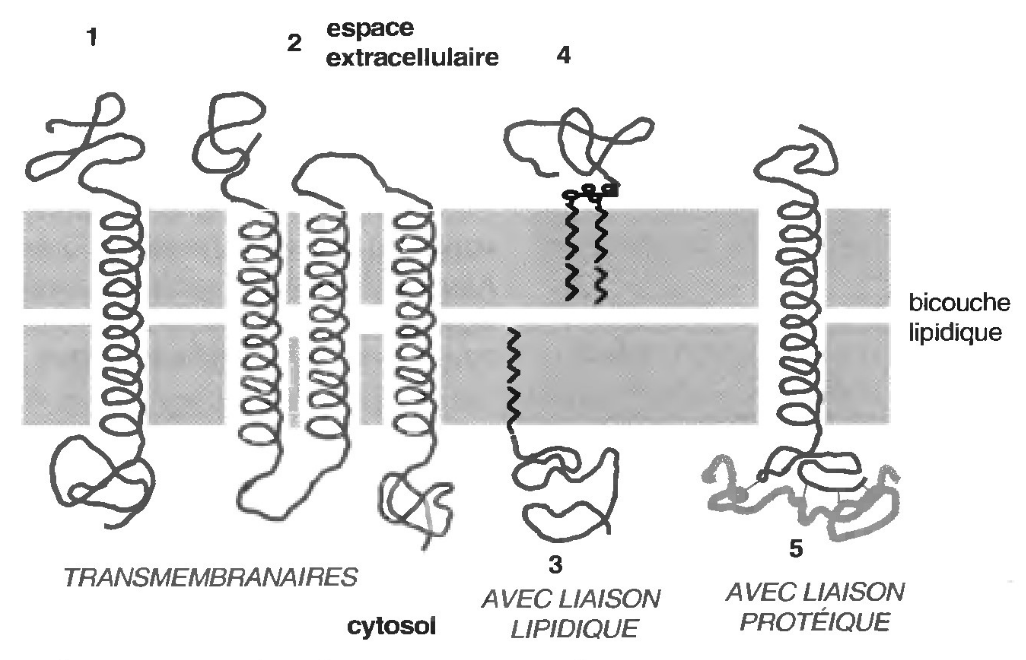


Fig. I-10 : Interaction (glyco) protéines/lipides dans la membrane.
1 et 2) Protéines transmembranaires avec une ou plusieurs hélices α.
3) Interaction protéine/lipide.
4) Interaction oligosaccharide/lipide.
5) Protéine périphérique interagissant avec une protéine transmembranaire.

anticorps sont ajoutés aux cellules en culture celles-ci s'agglutinent et une fluorescence de surface est observée (fluorescence verte) *(fig. I-11, A)* ;

– la même expérience est réalisée avec des cellules de souris en culture ; des anticorps AC2 marqués cette fois à la rhodamine provoquent une agglutination des cellules et un marquage fluorescent (fluorescence rouge) *(fig. I-11, B)* ;

– on réalise une fusion des deux types cellulaires (à l'aide d'un virus ou d'un agent chimique) ; on obtient ainsi des hybrides somatiques capables de survivre et même de proliférer en culture *(fig. I-11, C)* ;

– on ajoute les deux anticorps AC1 et AC2 à cette culture de cellules hybrides ; au temps 0, c'est-à-dire peu après la fusion, on observe des « arlequins » fluorescents, c'est-à-dire des hybrides sur lesquels les fluorescences vertes et rouges sont d'abord réparties par secteurs. Si on laisse incuber les cellules on s'aperçoit que les fluorescences se sont mélangées *(fig. I-11, D)*.

Au vu de ces résultats deux hypothèses peuvent être proposées : soit une redistribution des antigènes de surface a eu lieu, soit une nouvelle synthèse d'antigènes est intervenue pendant l'incubation. Pour trancher entre les deux hypothèses la même expérience peut être effectuée en bloquant la synthèse des protéines par la cycloheximide. On obtient le même résultat, ce qui confirme qu'il s'agit d'une **diffusion des protéines à l'intérieur de la bicouche lipidique** et démontre la ***fluidité de la membrane plasmique.***

La fluidité de la membrane ne demande pas d'énergie. Elle est seulement liée à une agitation moléculaire dans le plan de la bicouche. En revanche il semble que le flip-flop n'intervient pas ou n'intervient que très rarement. La fluidité est sous la dépendance de la température ; elle est ainsi bloquée au-dessous de 15 °C. Elle dépend aussi de la composition lipidique des membranes et en particulier du degré de saturation des lipides (plus ils sont insaturés plus la membrane est fluide) et de la présence du cholestérol.

- **La membrane est asymétrique**

L'asymétrie de la membrane concerne à la fois les lipides et les protéines. Ainsi la com-

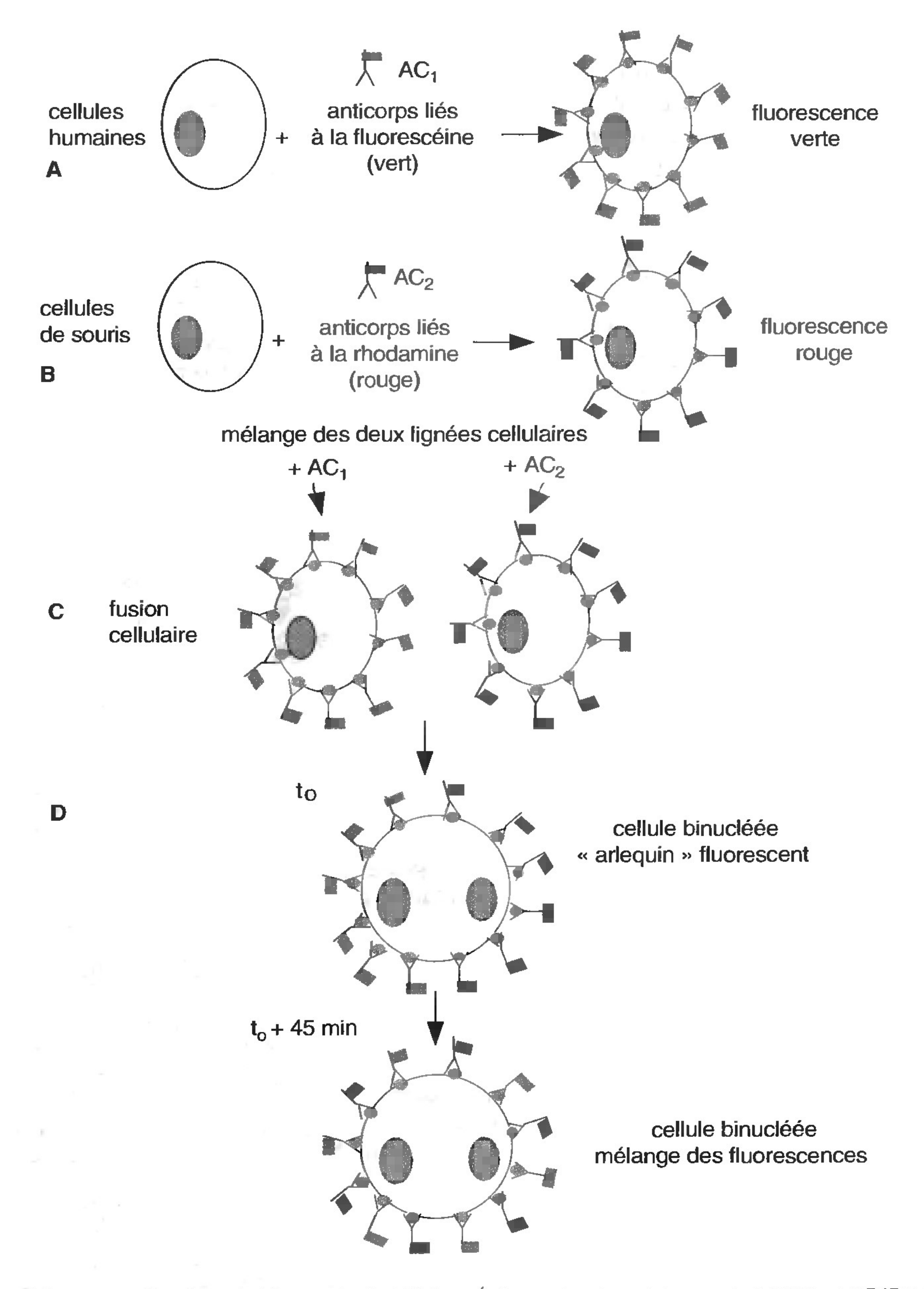


Fig. I-11 : **Expérience mettant en évidence la fluidité membranaire** (expérience de FRYE et EDIDIN, 1970).
A) Marquage par immunofluorescence verte de cellules humaines.
B) Marquage par immunofluorescence rouge de cellules de souris.
C) Mélange des lignées, marquage et fusion cellulaire.
D) Au bout de 45 minutes, les fluorescences, au départ séparées, se sont mélangées.

position en lipides est différente dans les deux couches qui constituent la membrane *(fig. I-13)*. Le rôle de cette asymétrie est encore peu connu.

En ce qui concerne les protéines, l'asymétrie joue à la fois pour les protéines périphériques et les protéines intégrées. L'organisation des glycoprotéines transmembranaires est tout à

fait caractéristique. La *figure I-12, A* montre ainsi que les chaînes oligosaccharidiques ne se trouvent que sur la face extracytoplasmique de la membrane tournée vers l'extérieur. Lorsque la protéine comporte des résidus cystéine, les ponts disulfure ne sont par ailleurs généralement établis qu'à l'extérieur de la cellule (le cytosol est un milieu réducteur qui empêche la formation de ceux-ci).

À titre d'exemple, la *figure I-12, B* montre la structure et le mode d'intégration dans la membrane de la **glycophorine**, une glycoprotéine transmembranaire caractéristique de la membrane des globules rouges.

	Hémimembrane externe	Hémimembrane interne
Phospholipides totaux	50%	50%
Sphingomyéline	20%	5%
Phosphatidylcholine	20%	10%
Phosphatidyléthanolamine	8%	22%
Phosphatidylsérine	0%	8%

Fig. I-13 : Principaux phospholipides des deux feuillets de la membrane plasmique des globules rouges.

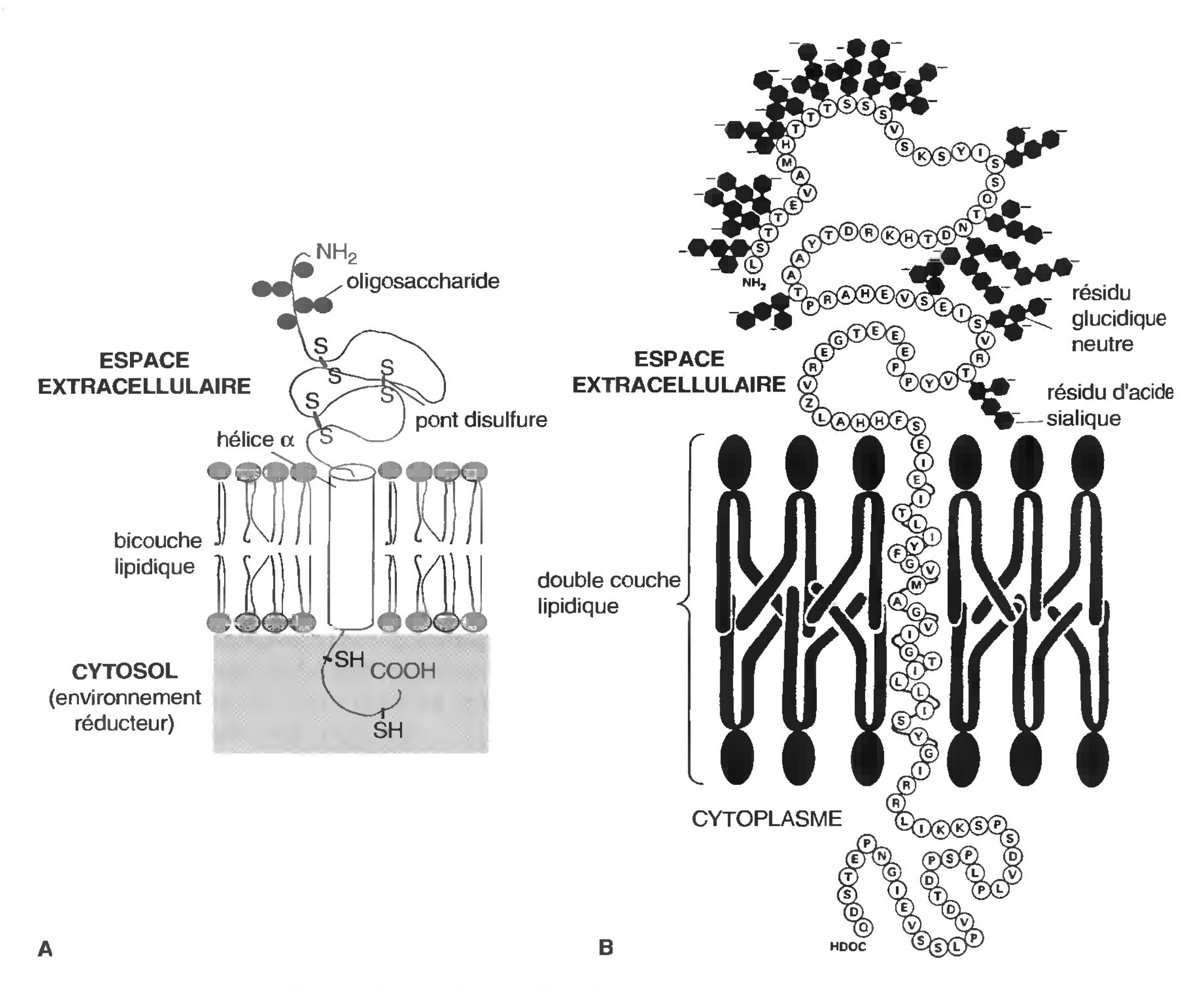


Fig. I-12 : Les glycoprotéines de la membrane plasmique.

A) Asymétrie dans l'organisation d'une glycoprotéine.

B) Exemple de la glycophorine. (*Reproduction de la figure 6.25 de B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J. WATSON. Biologie moléculaire de la cellule. Flammarion Médecine Sciences. 1983.*)

4. SPÉCIALISATIONS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

Les membranes plasmiques présentent deux types principaux de spécialisations : a) celles qui permettent une augmentation de la surface cellulaire donc des possibilités d'échanges, ce sont les *microvillosités* de la membrane ; b) celles qui jouent un rôle dans les relations intercellulaires, ce sont les *jonctions cellulaires.*

4.1. LES MICROVILLOSITÉS

Ce sont des projections de la membrane plasmique en forme de doigts, rencontrées dans les cellules animales spécialisées, en particulier les cellules épithéliales de l'intestin ou de la trachée.

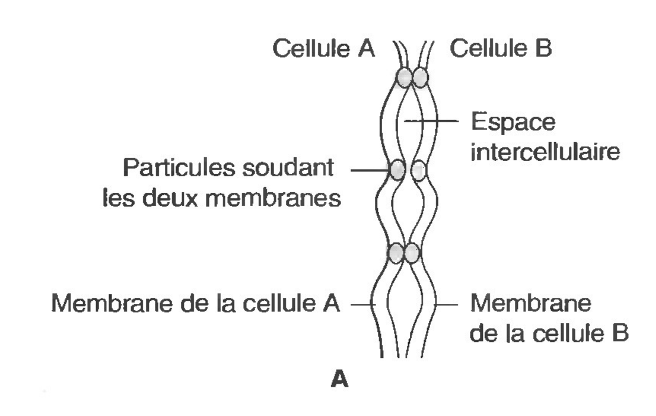
Parfois les microvillosités sont organisées de façon très régulière et correspondent au *plateau strié* décrit dans de nombreux types cellulaires à partir d'observations au microscope optique. On verra dans le chapitre consacré au cytosquelette (voir p. 276) que dans ces microvillosités un réseau très ordonné de microfilaments et de filaments intermédiaires est organisé.

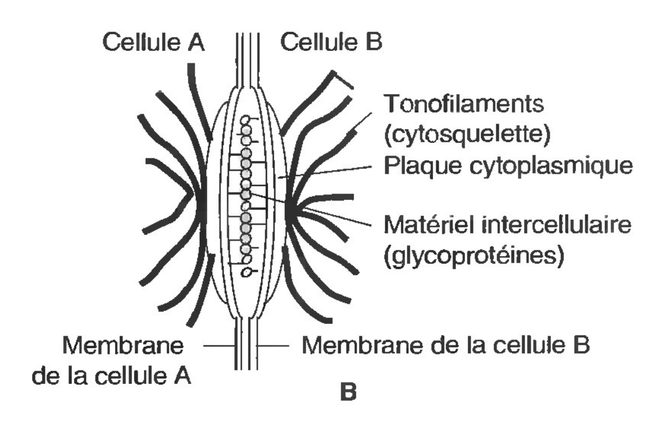
4.2. LES JONCTIONS DANS LES CELLULES ANIMALES

Sans entrer dans le détail de la description de tous les exemples de jonctions rencontrées dans les cellules animales on peut schématiquement classer les jonctions en 3 types (*fig. I-14*) :

– les **jonctions serrées** (*fig. I-14, A*) qui correspondent à des accolements des membranes plasmiques de cellules contiguës. On les rencontre surtout dans les membranes latérales des cellules épithéliales où elles forment des bandes continues encerclant complètement les cellules et formant ainsi une barre terminale, localisée en général sous les microvillosités. De part et d'autre de ces jonctions on a donc un compartiment externe et un compartiment interne pratiquement étanches ; les traceurs ne passent pas cette barrière. De telles jonctions assurent la **cohésion** et l'**étanchéité** des cellules ;

– les **desmosomes** (*fig. I-14, B*), qui maintiennent les cellules solidement liées, formant de véritable « boutons-pression ». À leur niveau un matériel glycoprotéique est accumulé dans l'espace extracellulaire modifié. Des éléments du cytosquelette sont directe-





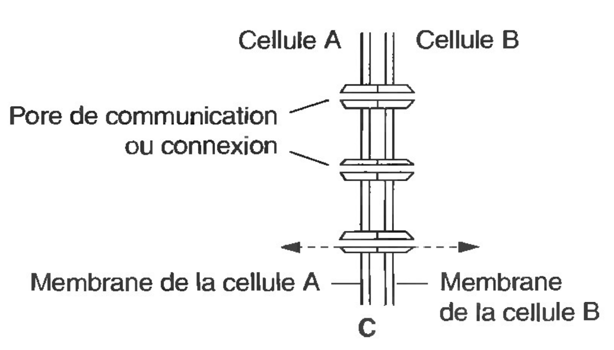


Fig. I-14 : Quelques jonctions des cellules animales.
A) Jonction serrée. Ce type de jonction est fréquent dans les cellules épithéliales.
B) Desmosome.
C) Jonction ouverte.

ment ancrés sur les desmosomes. Les desmosomes sont très abondants dans les cellules de la peau et contribuent à l'**adhérence** des cellules voisines;

– les **jonctions ouvertes** ou **jonctions à trous** *(fig. I-14, C)*, sortes de rivets munis d'un canal central, qui permettent le passage de petites molécules (de poids moléculaire inférieur à 1 500 daltons) d'une cellule à l'autre. Elles assurent une **communication** entre les cellules.

4.3. LES PLASMODESMES DES CELLULES VÉGÉTALES

Les cellules végétales sont recouvertes d'une paroi squelettique accolée au plasmalemme. La communication entre les cellules est assurée par les **plasmodesmes**, c'est-à-dire des interruptions locales de la paroi tapissées par le plasmalemme. Il s'agit donc de véritables ponts cytoplasmiques entre cellules voisines dans lesquels un réticulum endoplasmique modifié, souvent appelé le *desmotubule*, semble passer *(fig. I-15 et 16)*. Les plasmodesmes sont souvent groupés locale-

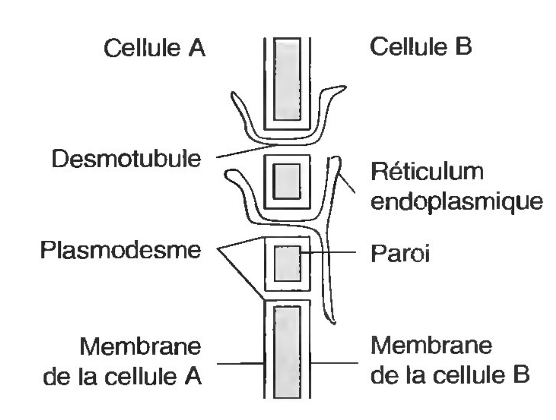
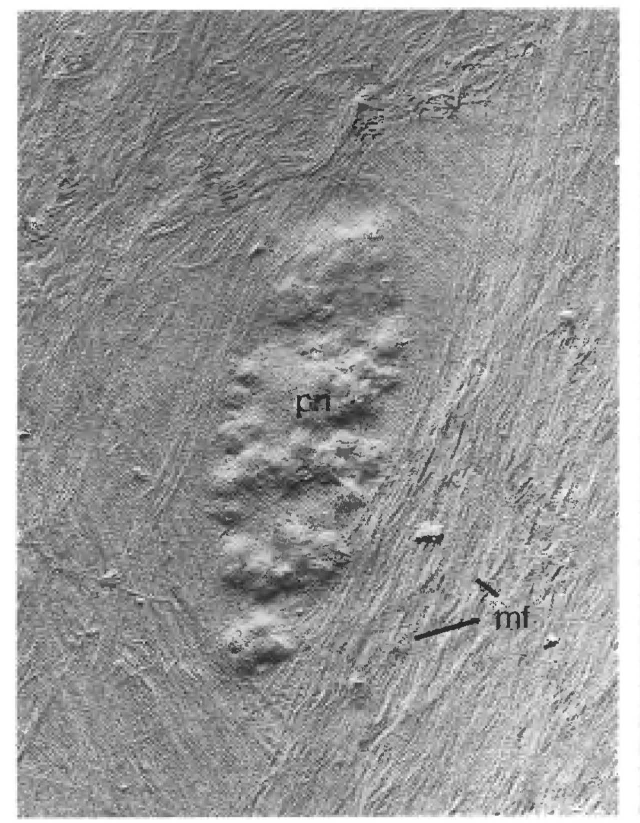
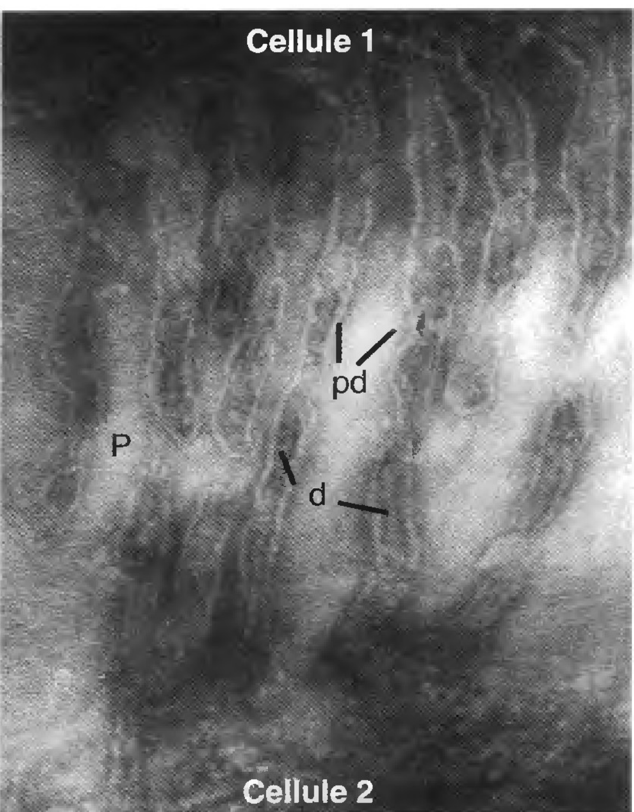


Fig. I-15 : Organisation schématique d'une jonction dans les cellules végétales.

A




B

Fig. I-16 : Les plasmodesmes, jonctions des cellules végétales.

A) Plage de plasmodesmes (ponctuation, pn) vue avec la technique d'ombrage. On remarque les microfibrilles (mf) de cellulose organisées autour de la ponctuation.

B) Plage de plasmodesmes vue après contraste négatif sur une coupe ultrafine à congélation. On remarque le desmotubule (d) à l'intérieur des plasmodesmes (pd) traversant la paroi (p).

(Clichés B. VIAN.)

ment, constituant ainsi des *ponctuations*, ou champs de plasmodesmes *(fig. I-16)*.

La question est encore posée de savoir comment se fait un passage sélectif à travers les plasmodesmes. On parle de **symplasme** (union des cytoplasmes) pour exprimer le fait de cette communication cellulaire en opposition avec l'**apoplasme** (au-delà du cytoplasme) que constitue le réseau pariétal péricellulaire.

5. PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES

5.1. TRANSPORT TRANSMEMBRANAIRE : GÉNÉRALITÉS

Une des stratégies importantes pour la cellule est de pouvoir contrôler les passages à travers sa membrane, que ce soit l'entrée des substances nutritives, la sortie des déchets et le passage des ions de façon à maintenir une concentration ionique optimale.

Avant d'analyser les mécanismes de transport transmembranaire, il est intéressant de comparer les propriétés de transport à travers les membranes artificielles (les liposomes) et à travers les membranes biologiques.

- **Transport à travers les membranes artificielles** *(fig. I-17)*

Les bicouches lipidiques sont perméables à l'eau et aux molécules hydrophobes, non polaires. *La traversée de la membrane se fait par simple diffusion dans le sens du gradient de concentration* c'est-à-dire du milieu le plus concentré vers le moins concentré. La vitesse de diffusion dépend de la taille de la molécule et de sa solubilité relative dans l'huile. Plus elle est petite, plus elle diffuse vite. Le passage de l'eau à travers une membrane essentiellement lipidique n'est pas sans poser des problèmes théoriques. Plusieurs hypothèses ont été proposées : une simple diffusion rendue possible par la très petite taille des molécules, un passage par des pores très étroits ou par des canaux un peu plus grands dans lesquels l'eau se trouve dans un état organisé excluant les solutés.

En revanche la bicouche est totalement imperméable à toutes les grosses molécules polaires, chargées ou non ; elle n'est par ailleurs pas traversée par les ions, qu'ils soient chargés négativement ou positivement.

- **Transport à travers les membranes biologiques**

Comme les membranes artificielles, *les membranes biologiques laissent passer l'eau et les molécules non polaires par une simple diffusion physique*. Le passage de l'eau est facilement mis en évidence par observation des changements de forme d'une hématie soumise à des variations de flux osmotiques. Si l'on change la pression osmotique du milieu environnant, la cellule réagit par des flux osmotiques *(fig. I-18)*.

Contrairement aux membranes artificielles, *les membranes biologiques sont perméables à certaines molécules polaires*. Elles laissent ainsi passer des ions, des oses, des acides ami-

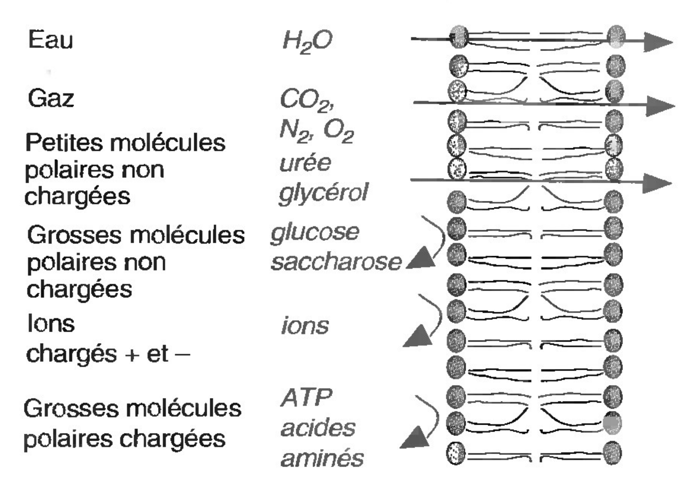


Fig. I-17 : Transport à travers une membrane artificielle.

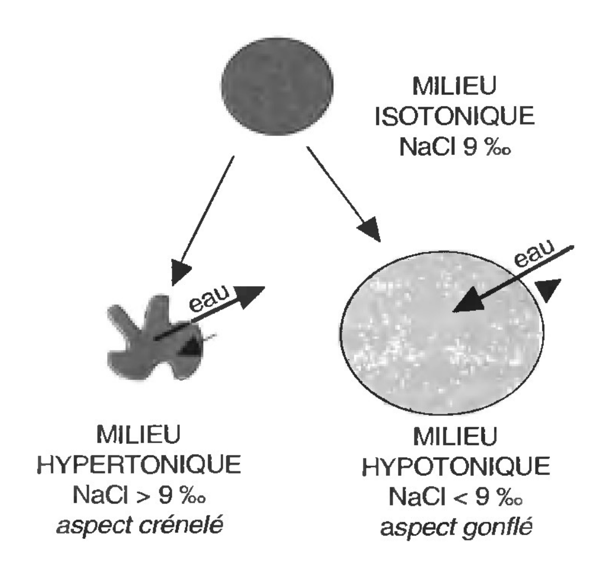


Fig. I-18: **Passage de l'eau à travers la membrane plasmique d'une hématie en fonction de la concentration extérieure.**
Les échanges d'eau sont bidirectionnels mais d'importance très inégale. La grosse flèche indique le mouvement apparent de l'eau.

nés, des nucléotides. La membrane plasmique est donc une **barrière sélective**. Nous allons envisager successivement les modalités de transport des petites molécules et des macromolécules.

5.2. TRANSPORT DES IONS ET DE PETITES MOLÉCULES

On distingue deux types de transport: le transport passif qui ne nécessite pas d'énergie et le transport actif qui est nécessairement couplé à une consommation d'énergie *(fig. I-19)*.

A. Transport passif

C'est le transport qui s'effectue dans le sens normal des forces de diffusion, c'est-à-dire dans le sens du gradient de concentration. On peut distinguer trois modalités de transport passif.

- Le transport par **simple diffusion physique**

C'est le cas le plus simple. Il concerne les substances liposolubles et peut-être en partie l'eau.

- Le transport par **diffusion accélérée**

Ce transport fait intervenir des protéines spécifiques intégrées dans la membrane. Elles forment souvent un conduit continu à travers cette membrane. Lorsque ce conduit transmembranaire permet le passage d'ions on parle de **canal ionique**. C'est aussi le mode de transport de petites molécules polaires.

Depuis quelques années l'importance des canaux ioniques a été révélée grâce aux résultats acquis avec la technique du « patch-clamp », c'est-à-dire des expériences d'électrophysiologie miniaturisées permettant l'exploration d'un seul canal ionique (voir p. 155).

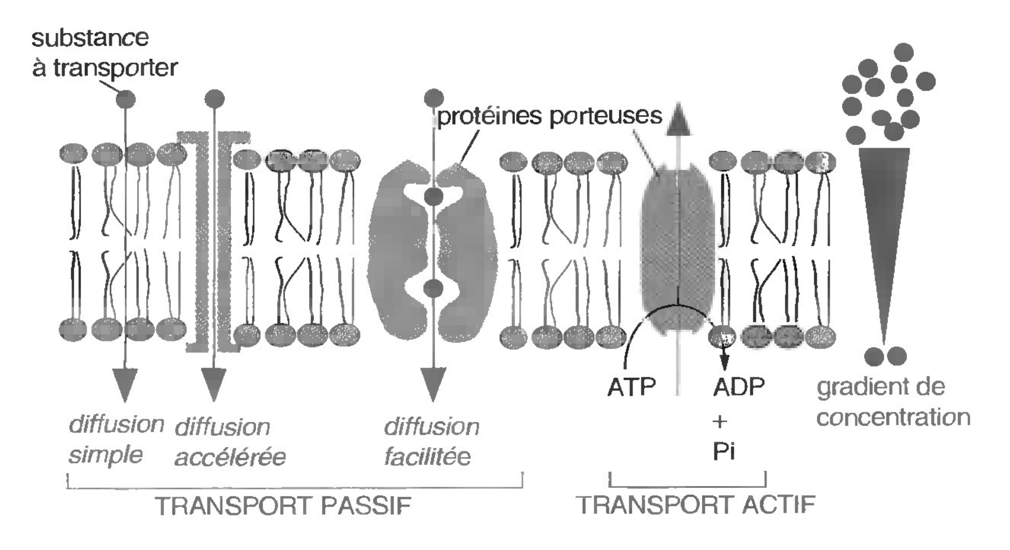


Fig. I-19: **Transport passif et actif à travers les membranes biologiques.**

• Le transport par **diffusion facilitée**

C'est l'exemple du transport de nombreux oses et acides aminés. Il fait intervenir des *protéines porteuses transmembranaires*. Le passage du glucose à travers la membrane plasmique en est un exemple type.

Le glucose est une substance peu liposoluble qui pénètre assez vite dans la cellule. On peut mesurer la vitesse de transport intracellulaire du glucose en fonction de sa concentration dans le milieu extérieur et la comparer à la vitesse théorique de transport si celui-ci était soumis aux lois de la diffusion simple *(fig. I-20)*. On obtient une courbe indiquant une vitesse maximum et traduisant un comportement tout à fait identique à celui déjà analysé pour les réactions enzymatiques. Il semble donc qu'il y a des protéines porteuses, appelées **perméases**, qui accélèrent la vitesse de transport du glucose mais cela jusqu'à un maximum, atteint lorsque toutes les perméases sont sollicitées.

On connaît maintenant de nombreuses perméases. *Ces perméases sont extrêmement spécifiques* et il en existe théoriquement autant que de molécules transportées. Toutes se comportent comme des protéines enzymatiques liées à la membrane : elles accélèrent la réaction, elles sont intactes après le passage du soluté et le processus de transport est sensible aux variations de température et de pH. *La différence principale est que la substance transportée n'est pas transformée contrairement au substrat de l'enzyme.*

Le phénomène de transport facilité peut donner lieu à des **inhibitions compétitives** ; il est donc très sélectif et implique au niveau des perméases des **sites de reconnaissance très spécifiques**. Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant le mode de fonctionnement des perméases. Il apparaît que les perméases pourraient être des protéines transmembranaires susceptibles de *changer de conformation* de manière réversible. Ainsi dans le *modèle « ping-pong »* la perméase exposerait son site de liaison d'un côté de la membrane (état ping) et, par un changement conformationnel, l'exposerait ensuite de l'autre côté de la membrane (état pong) favorisant ainsi la translocation de la substance à transporter *(fig. I-21)*.

Les perméases peuvent aussi transporter simultanément (ou séquentiellement) deux substances différentes. On parle alors de **cotransport**. Les substances peuvent être

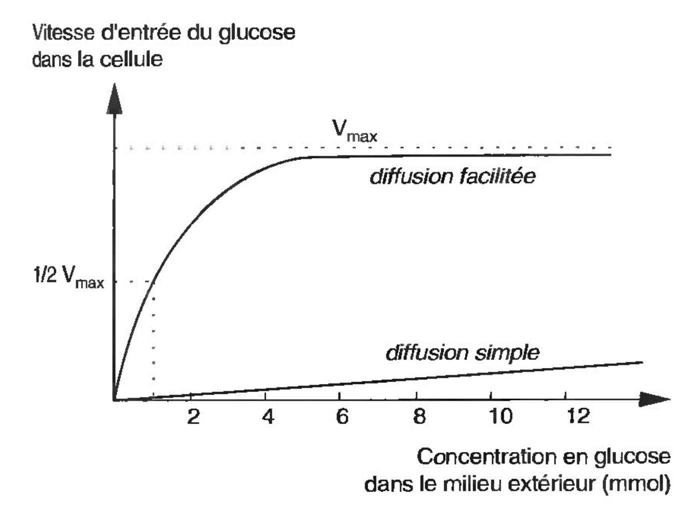


Fig. I-20 : La diffusion facilitée. Exemple du glucose.

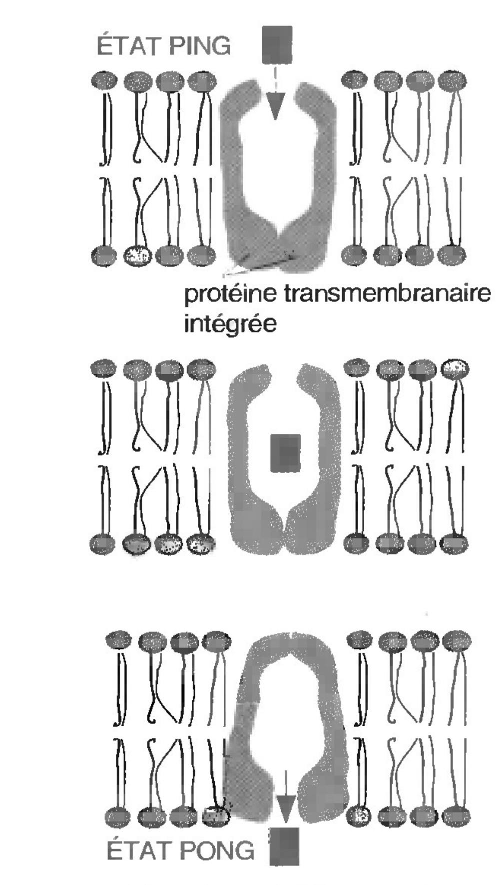


Fig. I-21 : Schéma hypothétique expliquant la diffusion facilitée (exemple du glucose).

cotransportées soit dans la même direction (**cotransport unidirectionnel** ou **symport**) soit dans des directions opposées (**cotransport bidirectionnel** ou **antiport**) *(fig. I-22)*.

B. Transport actif

C'est le transport qui s'effectue à contre-courant des forces normales de diffusion, à l'opposé du gradient de concentration *(fig. I-19)*. Ce transport doit être couplé à une source d'énergie métabolique. On parle alors de **pompes moléculaires**. Un modèle de pompe moléculaire dont le fonctionnement est bien connu est la **pompe à sodium/potassium**.

La *figure I-23* rappelle les concentrations respectives de ces deux ions dans la cellule et son environnement à partir d'un exemple bien connu, l'hématie dans son milieu environnant, c'est-à-dire le plasma sanguin. Les cellules sont fortement enrichies en potassium et pauvres en sodium alors que le plasma est fortement enrichi en sodium et pauvre en potassium.

En fait si on marque le sodium par un traceur radioactif on s'aperçoit qu'il entre facilement dans la cellule, c'est-à-dire dans le sens du gradient de concentration, mais aussi qu'il est rejeté activement par la cellule. Il y a donc un **transport actif** qui contrebalance le transport passif.

La mise en évidence d'une pompe Na^+/K^+ a été surtout effectuée à partir d'expériences sur des axones géants des cellules nerveuses de calmars. Il s'agit de prolongements cellulaires très longs (de l'ordre de plusieurs centimètres), de diamètre environ 1 mm, dans lesquels il est facile d'introduire des substances par microinjection *(fig. I-24)*:

– les axones sont vidés de leur contenu; on injecte de l'ATP et du sodium radioactif; après ligature des deux extrémités les axones sont placés dans de l'eau de mer, c'est-à-dire un milieu riche en sodium et pauvre en potassium. Au bout de quelque temps sort le sodium radioactif malgré la forte concentration en Na de l'eau de mer;

– la même expérience est effectuée mais sans apport d'ATP: on n'observe plus de sortie de sodium. **Il s'agit donc d'un transport actif puisqu'il nécessite de l'énergie**;

– la même expérience est effectuée (en présence d'ATP) mais l'axone est placé dans un milieu totalement dépourvu de potassium: on observe une diminution de la sortie de sodium radioactif. **Il s'agit donc d'un cotransport bidirectionnel potassium/sodium.**

Qu'en est-il au niveau moléculaire? La *figure I-25* montre schématiquement les étapes possibles de ce transport d'ions à travers une membrane plasmique. Le fonctionnement de la perméase, ici une ATPase, est rendu possible par des changements de conformation qui nécessitent un apport d'énergie.

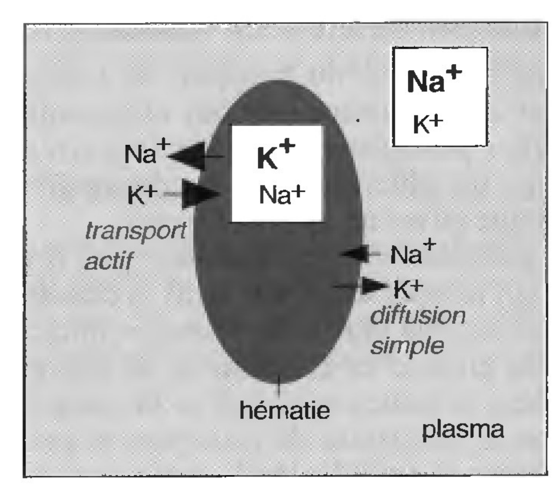


Fig. I-23: Mouvement du sodium et du potassium dans les hématies.

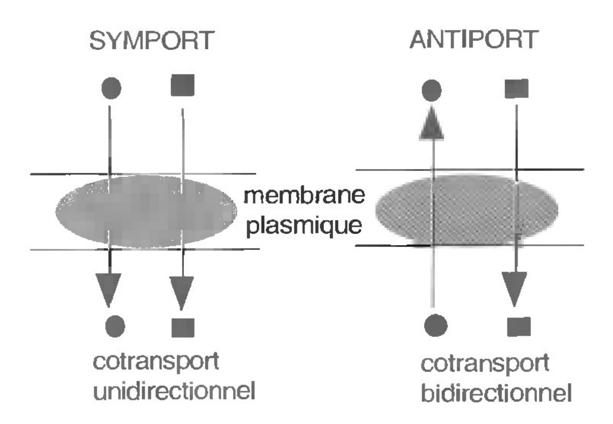


Fig. I-22: Cotransport de deux substances: symport et antiport.

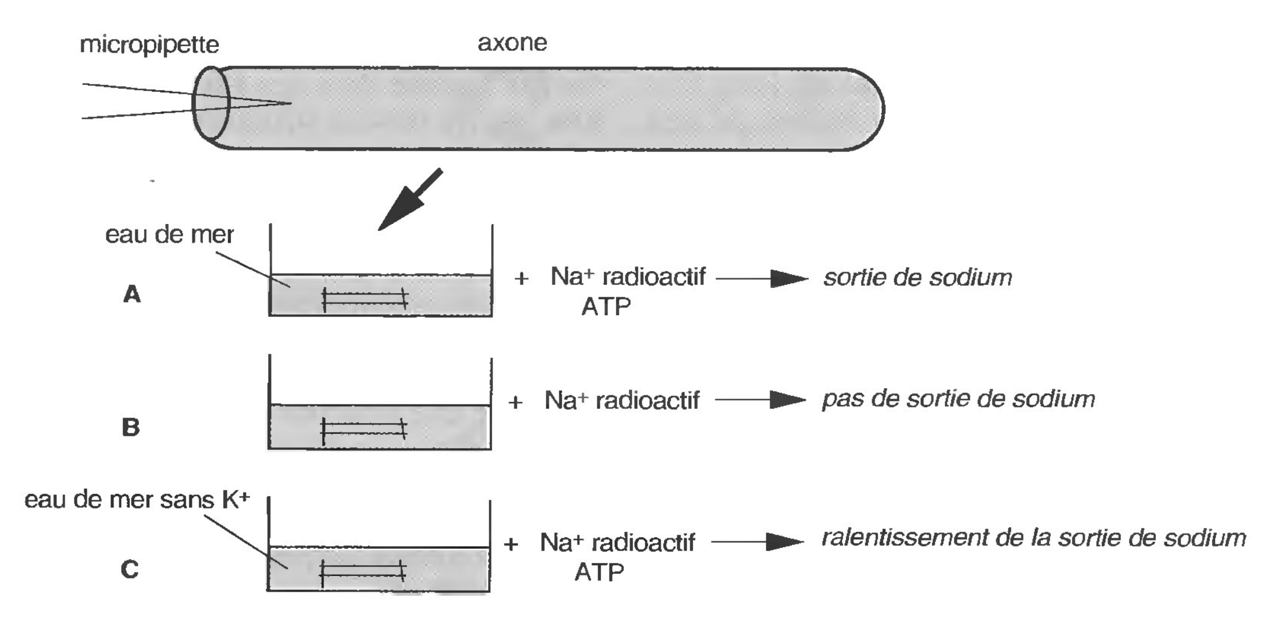


Fig. I-24 : Mise en évidence expérimentale d'une ATPase Na^+/K^+ sur des axones géants de calmars.

MILIEU EXTRACELLULAIRE
ATP → ADP
CYTOSOL
A Na⁺ Na⁺ Na⁺
B P
C K⁺ K⁺ Na⁺ Na⁺ Na⁺ P
D P
E K⁺ K⁺ P - OH

Fig. I-25 : La pompe à sodium/potassium. Fonctionnement hypothétique.

A) Liaison de 3 Na^+ (pompe à conformation ouverte vers l'intérieur).
B) Phosphorylation de la protéine par l'ATP.
C) La phosphorylation a conduit à un changement de conformation qui provoque la translocation des 3 Na^+ vers l'extérieur.
D) La nouvelle conformation favorise la fixation de 2 K^+.
E) Déphosphorylation de la protéine qui retourne à sa conformation initiale et conduit à la translocation de 2 K^+ vers l'intérieur de la cellule.

De nombreuses ATPases ont été maintenant décrites qui pompent activement les ions. Les conséquences du fonctionnement de ces ATPases sont nombreuses. Elles engendrent les **gradients ioniques** qui sont nécessaires pour les activités enzymatiques. Elles engendrent aussi un gradient de K^+ à la surface de certaines membranes. C'est ce gradient qui crée un **potentiel de membrane** et est en particulier à la base d'une propriété essentielle des cellules nerveuses et musculaires, leur excitabilité.

5.3. TRANSPORT DE MACROMOLÉCULES ET DE PARTICULES

La membrane plasmique est le véhicule d'entrée (endocytose) et de sortie (exocytose) de nombreuses grosses molécules, d'assemblages moléculaires ou de particules de tailles variables.

A. Endocytose

Les modalités de transport dépendent de la taille des éléments ingérés. On parle de **phagocytose** (du grec *phagein*, manger) lorsqu'il s'agit d'éléments solides de grande taille (par exemple de la taille d'une bactérie) et de **pinocytose** (du grec *pinein*, boire) lorsqu'il s'agit d'un matériel fluide de petite taille (autour de 50 nm), souvent sous forme de gouttelettes extracellulaires.

- **La phagocytose**

Chez les Protozoaires, par exemple les amibes, la phagocytose est une forme courante d'alimentation. Chez les Métazoaires il existe des cellules « professionnelles » pour ingérer des particules de grande taille : c'est le cas des macrophages, cellules mobiles présentes dans tous les tissus et le sang ; c'est aussi le cas des globules blancs, par exemple les leucocytes polynucléaires.

Des protéines de la membrane plasmique reconnaissent la bactérie ou la particule étrangère qui devient ainsi fixée en surface par des liaisons labiles. Après invagination, la bactérie devient enclose dans une **vacuole de phagocytose** qui ira ensuite fusionner avec le système lysosomal pour être détruite (voir p. 310).

- **La pinocytose**

C'est un phénomène très général dans les cellules animales. Le matériel est ingéré par invagination de la membrane plasmique qui constitue une vésicule de pinocytose. Il s'agit souvent d'une **endocytose avec internalisation de récepteurs**. Les modalités de cette endocytose commencent à être connues.

L'endocytose du vitellus, c'est-à-dire des réserves de l'ovocyte peut être prise pour exemple. Le vitellus constitue en effet une masse énorme de réserves protéiques. Cette masse n'est toutefois pas synthétisée dans l'ovaire, mais dans les hépatocytes sous forme de **vitellogénine**, un précurseur du vitellus, qui passe dans la circulation ; il est ensuite internalisé dans les ovocytes par un mécanisme de pinocytose. La *figure I-26* montre les principales étapes de cette internalisation qui fait intervenir des **récepteurs spécifiques** et des **puits et vésicules recouverts**. On peut retracer les principales étapes :

– la vitellogénine, c'est-à-dire le ligand, se fixe spécifiquement sur des récepteurs contenus dans la membrane plasmique des ovocytes *(fig. I-26, a)* ;

– les récepteurs se regroupent dans des dépressions de la membrane ; du côté cytosolique ces dépressions, ou puits, se recouvrent d'un manteau de **clathrine**, protéine de structure fibreuse. La clathrine est un complexe protéique formant des structures à trois branches, les triskélions *(fig. I-27, C)*. Ceux-ci s'assemblent en formant un réseau hexagonal et organisent autour des dépressions de véritables « cages », formant ainsi des **puits recouverts** *(fig. I-26, b)* ;

– les puits recouverts s'internalisent constituant ainsi d'abord des **vésicules recouvertes** (ou **vésicules mantelées**) puis forment des sacs scellés et reconnaissables autour de la vitellogénine *(fig. I-26, c et d et fig. I-27, A et B)* ;

– les vésicules recouvertes perdent ensuite leur manteau de clathrine, fusionnent et

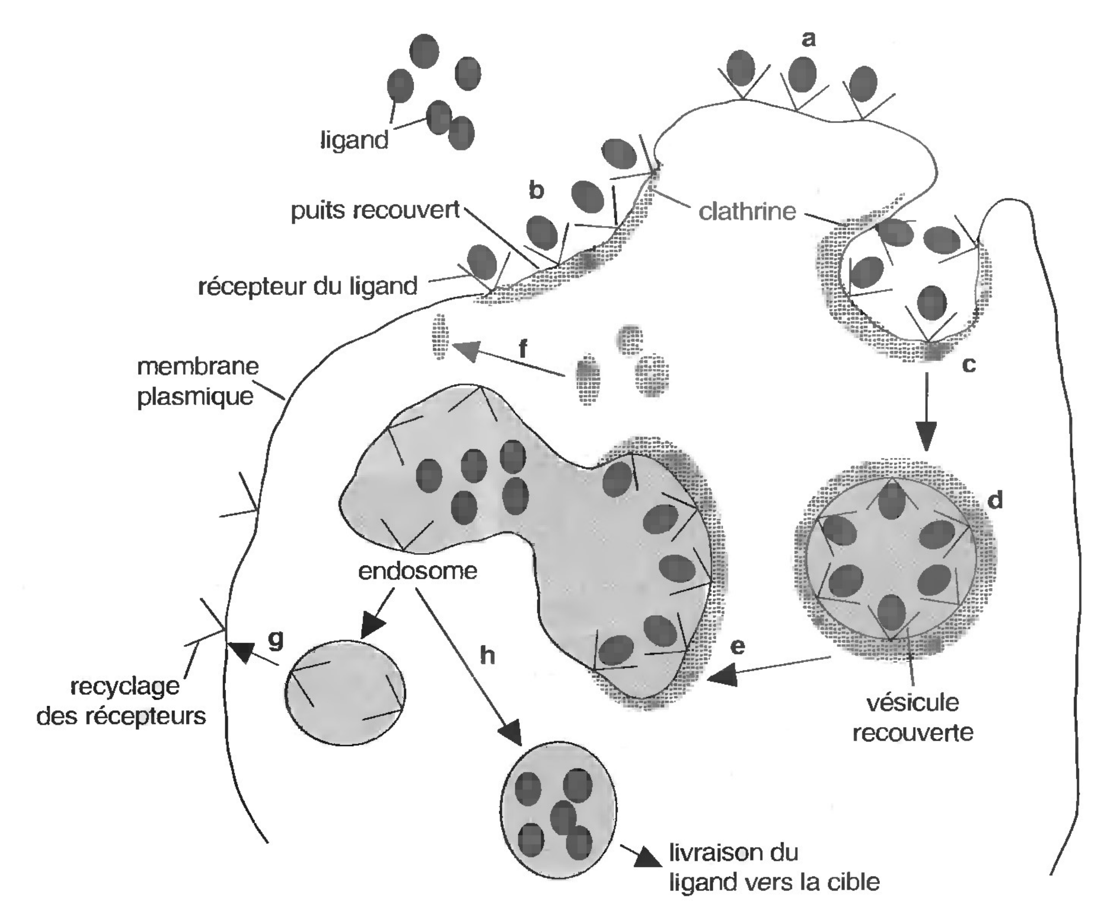


Fig. I-26 : La pinocytose. Schéma d'interprétation.

forment un **endosome** au niveau duquel la vitellogénine se sépare de ses récepteurs membranaires *(fig. I-26, e)*. Une compartimentation intervient qui permet alors, d'une part, la livraison de la vitellogénine vers l'endroit cible (c'est-à-dire le grain de vitellus) *(fig. I-26, h)* et, d'autre part, le recyclage rapide des récepteurs vers la membrane plasmique *(fig. I-26, g)* et de la clathrine dans le cytosol *(fig. I-26, f)*.

B. L'exocytose

C'est le mécanisme selon lequel des substances sont exportées à l'extérieur de la cellule. Ces mécanismes seront étudiés en détail dans le chapitre traitant des compartiments endomembranaires.

5.4. TRANSFERT D'INFORMATIONS : QUELQUES EXEMPLES

C'est une fonction très importante de la membrane plasmique. Deux exemples seront envisagés dont les mécanismes sont assez bien connus : la transmission de l'influx nerveux, par exemple dans les jonctions neuro-musculaires, et la transmission de l'information véhiculée par les hormones.

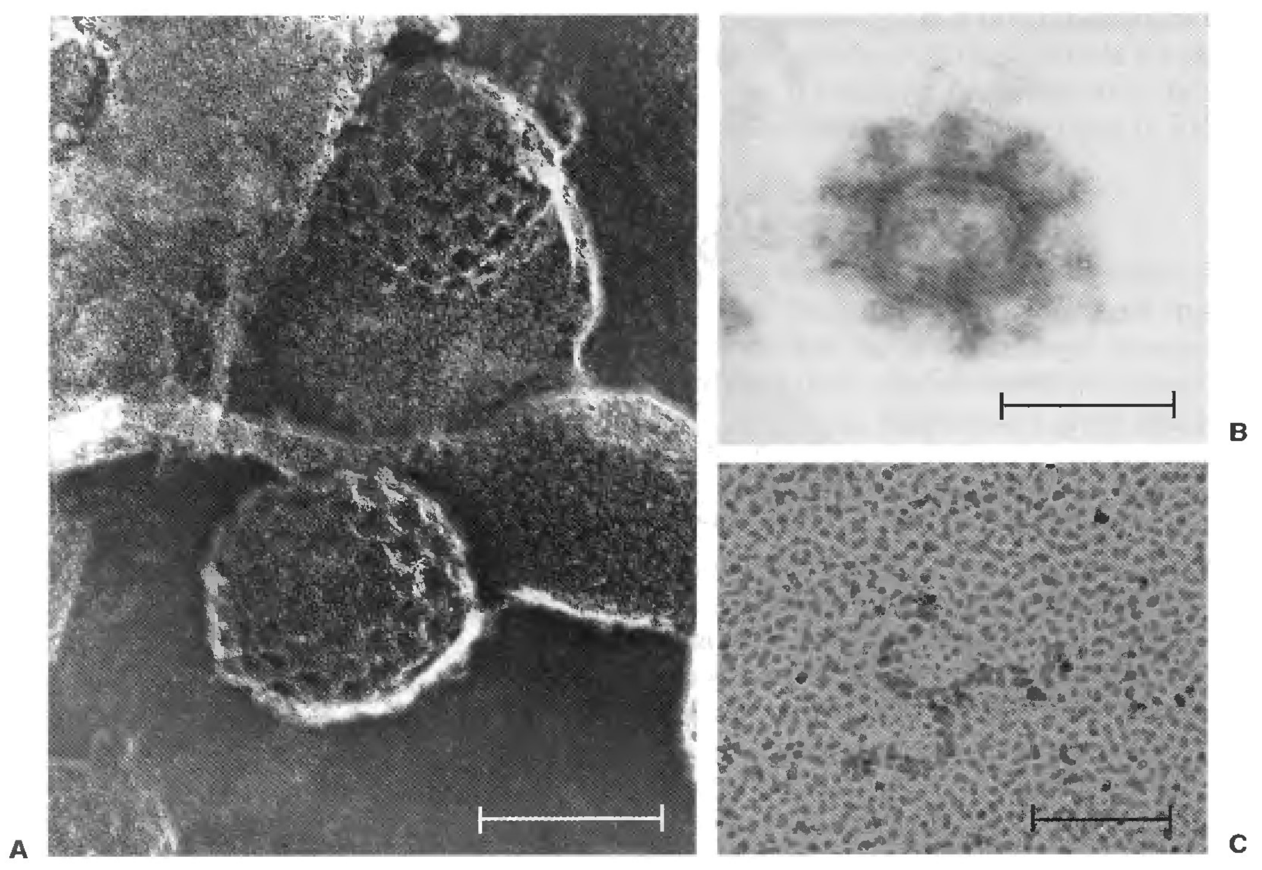


Fig. I-27 : Organisation des vésicules recouvertes.
A et B) Réseau polygonal autour de vésicules recouvertes observées après congélation ultrarapide à l'hélium liquide, cryodécapage prolongé et ombrage au carbone/platine (A), et après inclusion dans une résine et contraste positif (B). La barre indique 100 nm (A) et 50 nm (B).
C) Détail d'un triskélion de clathrine isolé observé après ombrage rotatif. La barre indique 50 nm.
(Reproduction des figures 9 (A), 13 (B) et 15 (C) de J. COLEMAN, D. EVANS et C. HAWES. Plant coated vesicles. Plant, Cell and Environment 1988 ; 11 : 669-684.)

A. Transmission de l'influx nerveux

Une jonction neuro-musculaire est la zone de contact entre une extrémité d'un axone et une fibre musculaire. La transmission de l'influx nerveux se fait au niveau de la fente synaptique *(fig. I-28)*.

Le passage de l'influx nerveux provoque une exocytose massive des vésicules synaptiques de l'axone chargées de **neurotransmetteur** (ou médiateur chimique). Une grande quantité de molécules de neurotransmetteur se trouve ainsi libérée au-delà de la membrane présynaptique dans la fente synaptique. Elles sont reconnues par des **récepteurs** spécifiques localisés dans la membrane post-synaptique, c'est-à-dire la membrane de la cellule musculaire. Leur fixation sur le récepteur provoque un changement de configuration des protéines membranaires qui forment alors un canal ionique transmembranaire. La conséquence est un changement de perméabilité au calcium et au potassium, une dépolarisation de la membrane et une possibilité de contraction musculaire.

Le mécanisme est très **spécifique** en raison de la reconnaissance très étroite récepteur/neurotransmetteur. Les **poisons** sont nombreux. Par exemple dans le cas des jonctions neuromusculaires dont le médiateur chimique est l'acétylcholine, des poisons agissent sur l'acétylcholinestérase dont la fonction est d'hydrolyser très rapidement l'acétylcholine en excès dans la fente synaptique. Certains poisons se fixent sur le site actif de l'enzyme, sou-

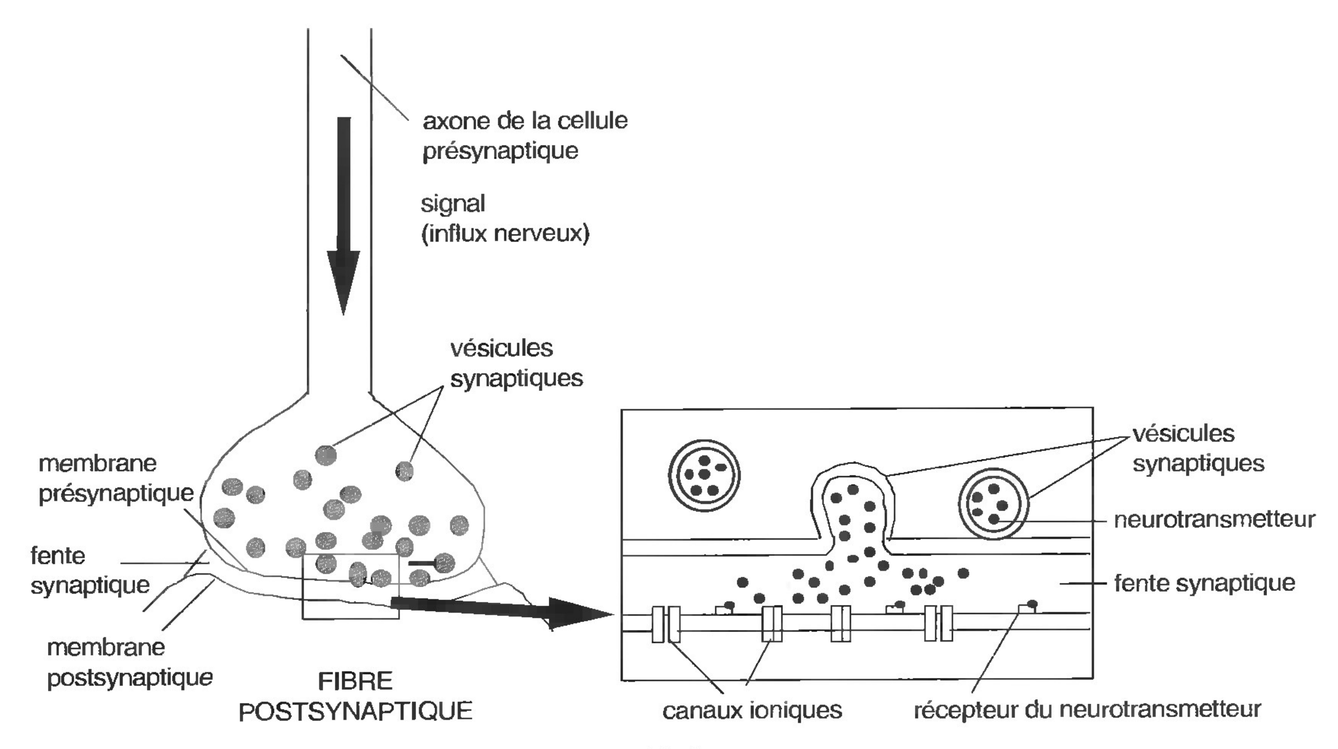


Fig. I-28 : Transmission de l'information. Synapse chimique.

vent par liaison covalente donc irréversible : c'est le cas de l'ésérine, de nombreux insecticides puissants tels ceux à base de parathion. D'autres poisons entrent en compétition avec l'acétylcholine sur les récepteurs : c'est le cas du curare bien connu des tribus indiennes pour préparer des flèches mortelles et des anesthésistes qui utilisent ses dérivés pour immobiliser les patients au cours d'une opération ; c'est aussi le cas du venin de cobra qui paralyse une proie en quelques minutes...

Le fonctionnement des protéines qui constituent les *canaux ioniques* est maintenant bien connu grâce à de nombreuses expériences de *patch-clamp* mises au point par une équipe de chercheurs allemands à partir de 1976. Le principe de la technique est simple sur le plan théorique *(fig. I-29)* : on plaque très étroitement contre la membrane une micropipette de diamètre voisin de 1 micromètre remplie d'un électrolyte conducteur. Lorsqu'on réussit à souder l'électrode à la membrane (ce qui reste techniquement relativement difficile), on isole électriquement une toute petite surface de membrane et on peut mesurer ainsi le courant qui passe dans un seul canal ionique. Avec cette méthode il devient même possible de séparer ce fragment de membrane collé à la pipette et d'étudier son fonctionnement en dehors de la cellule, dans un environnement bien déterminé et contrôlable.

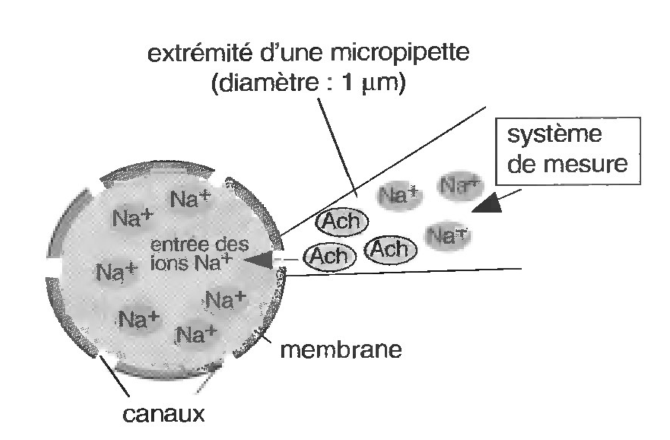


Fig. I-29 : La technique du *patch-clamp*.
Exemple de mesure des courants produits dans un canal ionique d'axone géant de neurone de calmar. L'influx nerveux est produit par des déplacements d'ions dans les canaux dont l'ouverture est commandée par un neurotransmetteur (ici l'acétylcholine).
(Adapté de J. JOVALEVSKY. Comment nous pleurons. Pour la Science, Août 1984.)

B. Transmission humorale

Les hormones sont des composés qui ne rentrent pas dans les cellules mais qui délivrent leur message à la membrane plasmique. La *figure I-30* montre comment s'effectue la ***transduction du signal***, en d'autres termes comment le message est reçu et transformé au niveau de cette membrane pour être amplifié et exécuté. Il s'agit du message d'une hormone peptidique, l'adrénaline.

L'adrénaline est une hormone sécrétée par les glandes surrénales. Lors d'une agression, l'adrénaline est déchargée dans le sang et va agir sur des cellules cibles (cellules du foie ou cellules musculaires) de façon à stimuler la dépolymérisation du glycogène et ainsi augmenter la concentration de glucose dans le sang pour faire face à l'agression.

Sur la membrane de la cellule cible, l'adrénaline est reconnue et se fixe sur un site stéréospécifique d'un récepteur, protéine transmembranaire. Le récepteur activé s'associe à une protéine G, protéine transductrice liée à la face cytosolique de la membrane qui est elle-même activée (par fixation de GTP, ce qui explique son nom). La protéine G sert de navette et va activer une autre protéine transmembranaire, l'adénylate cyclase. Le nouveau complexe formé a une forte affinité pour l'ATP. L'activation de l'adénylate cyclase en permet l'hydrolyse libérant ainsi un AMP cyclique qui va alors provoquer une activation en cascade des enzymes intracellulaires du métabolisme des glucides.

Au total, la membrane plasmique a reçu l'information de l'hormone qui est donc le **premier messager extracellulaire.** L'interaction entre récepteur et adénylate cyclase est transmise par la protéine G. Grâce à l'enzyme le message est transformé et véhiculé par l'AMP cyclique, **deuxième messager intracellulaire**. Comme cela est souvent le cas dans les mécanismes enzymatiques le message a été **amplifié** (avec une seule molécule d'hormone de nombreuses molécules d'AMP cyclique sont formées).

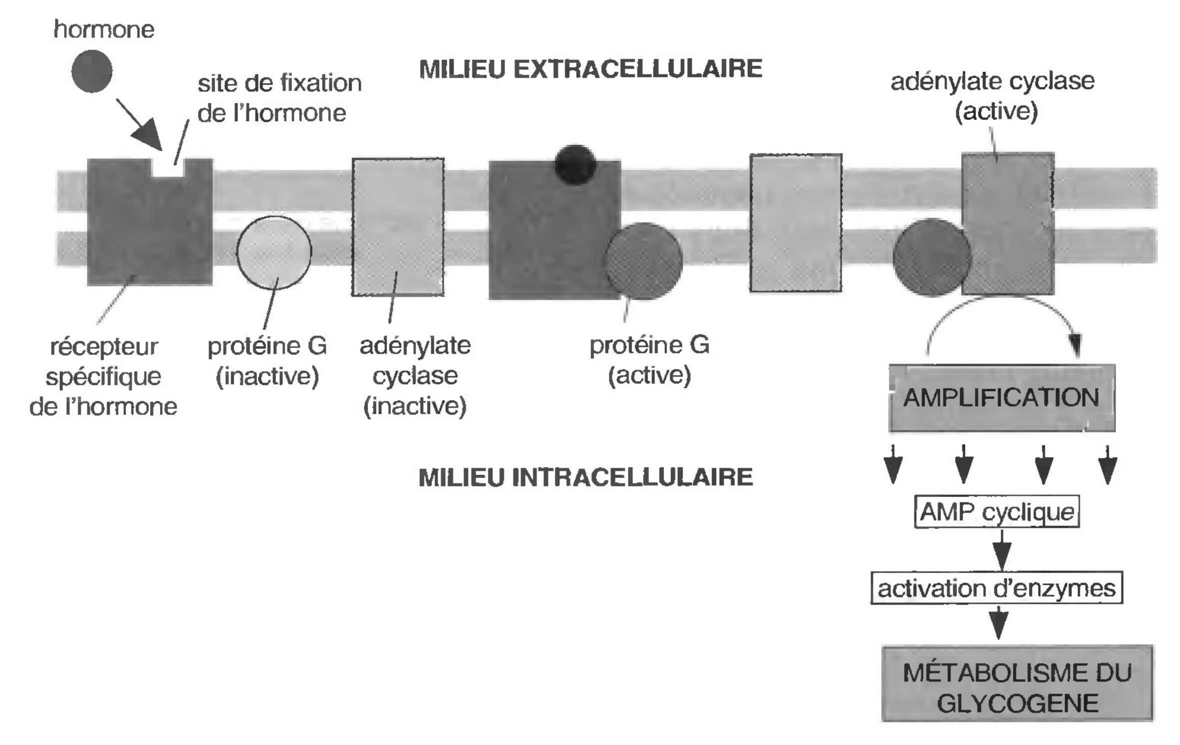


Fig. I-30 : La membrane plasmique et la transduction du signal.
Exemple de la transmission d'un message hormonal. L'hormone, premier messager extracellulaire, est reconnue par un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique. Le message est relayé par la protéine G et l'adénylate cyclase. Il est ensuite transmis à un deuxième messager, intracellulaire (ici l'AMP cyclique), et amplifié.

5.5. RECONNAISSANCE ET ADHÉRENCE CELLULAIRE

Comment les cellules se reconnaissent-elles ? Comment les cellules reconnaissent-elles le soi du non-soi, en d'autres termes comment les cellules règlent-elles leurs « problèmes de société » ? Comment les cellules, lorsqu'elles se reconnaissent comme compatibles, établissent-elles les interactions qui leur permettent une adhérence plus ou moins durable ? Comment les cellules se lient-elles à la matrice extracellulaire qui constitue leur environnement le plus proche ?

Nous avons vu dans ce chapitre (voir p. 145) quelques types de jonctions cellulaires rencontrées dans des organismes matures. La question reste donc de tenter de comprendre les mécanismes qui interviennent lors de la construction embryonnaire des organismes animaux et qui font intervenir des migrations cellulaires et des associations cellulaires spécifiques. Une simple expérience permet d'apporter des éléments de réponse à quelques-unes de ces questions. Elle est effectuée à partir de cellules embryonnaires de Vertébrés qui sont expérimentalement dissociées et réassociées *(fig. I- 31)* :

– des massifs embryonnaires de cellules rénales sont dissociés par action de la trypsine (une enzyme protéolytique qui digère le ciment intercellulaire) et en présence d'EDTA (éthylène-diamine acide tétra-acétique), un chélateur du calcium dont on connaît le rôle dans l'adhésion cellulaire *(fig. I-31, a)*. Les cellules dissociées sont ensuite réincubées en l'absence de trypsine : on obtient des **agrégats cellulaires**, ce qui indique que les cellules ont en surface des systèmes qui permettent cette réassociation. La même expérience est effectuée en parallèle avec des cellules embryonnaires de foie *(fig. I-31, b)* ;

– après dissociation des deux types cellulaires, les cellules de rein et de foie sont mélangées et réincubées en l'absence de trypsine : on obtient des agrégats séparés de cellules de rein et de cellules de foie, ce qui indique que la reconnaissance de surface n'a pu s'effectuer que pour des cellules appartenant au même type cellulaire : la **reconnaissance cellulaire est donc spécifique** *(fig. I-31, c)* ;

– des cellules dissociées de rein sont mélangées à des cellules transformées (des cellules cancéreuses) et réincubées en l'absence de trypsine : on obtient des agrégats cellulaires avec mélange des deux types cellulaires, les cellules cancéreuses étant réparties au hasard dans les agrégats *(fig. I-31, d)*. Ceci indique que les **cellules cancéreuses ont perdu la capacité de reconnaissance et la spécificité de l'adhésion**.

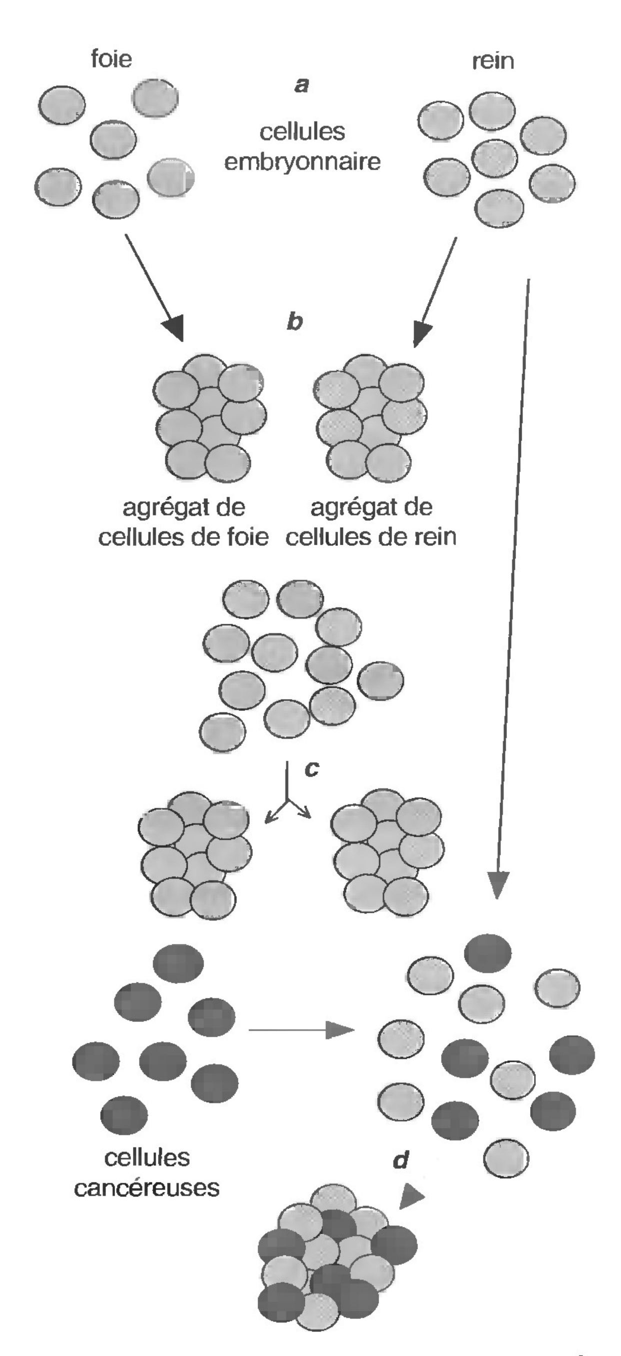


Fig. I-31 : Expérience mettant en évidence la spécificité de l'agrégation cellulaire.
(D'après W.M. BECKER. The world of the cell. 1986.)

Quelle est la base moléculaire de l'adhérence intercellulaire sélective observée au début de l'expérience ? Il a été montré qu'il existe deux classes de molécules contrôlant la reconnaissance et l'adhérence des cellules animales *(fig. I-32)*. La première classe est représentée par les **cadhérines**, qui constituent une superfamille de molécules adhésives dépendantes du calcium pour leur fonctionnement. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires à traversée unique, composées habituellement de 700 à 750 acides aminés. Par leur domaine cytoplasmique les cadhérines sont le plus souvent associées au cytosquelette terminal *via* d'autres protéines de liaison, ce qui renforce les accrochages cellules/cellules. Une autre classe est constituée par les glycoprotéines **CAM** *(Cell Adhesion Molecule)*, indépendantes du calcium, qui sont membres de la superfamille des immunoglobulines. Elles sont très représentées dans le tissu nerveux.

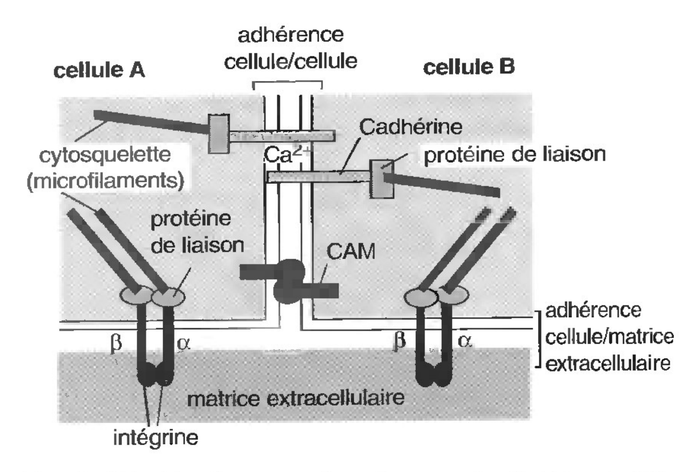


Fig. I -32: Quelques mécanismes d'adhérence cellule/cellule et cellule/matrice extracellulaire dans les organismes animaux.

En ce qui concerne l'adhérence cellule/milieu, une autre catégorie de molécules adhésives est constituée par les **intégrines**, qui sont les récepteurs permettant aux cellules animales de se lier à la matrice extracellulaire. Elles sont composées de deux sous-unités glycoprotéiques transmembranaires, les sous-unités α et β, dont la composante glucidique est riche en acide sialique. Elles agissent comme des liens dépendants de cations bivalents. Les intégrines sont très abondantes en surface et, bien que leur affinité avec le ligand soit faible, cette abondance assure au système une adhérence de type « Velcro », facile à accrocher mais aussi à décrocher. Les intégrines sont aussi souvent liées au cytosquelette par des protéines de liaison: elles permettent donc au cytosquelette et à la matrice extracellulaire de « communiquer » à travers la membrane plasmique. Elles assurent ainsi une certaine transduction de signaux et sont souvent à l'origine de l'activation de cascades de réactions intracellulaires.

Nous n'entrerons pas dans l'analyse de tous les événements qui peuvent intervenir lors de la « transformation » des cellules et qui pourraient expliquer en partie la non-capacité d'adhésion des cellules cancéreuses observée dans la deuxième partie de l'expérience. Entre autres changements possibles, de nombreuses modifications concernent la membrane plasmique : augmentation de la fluidité et de la mobilité des récepteurs, perte de l'adhérence, changements des propriétés de transport... En ce qui concerne l'adhérence, on sait maintenant que le niveau d'expression de certaines cadhérines des épithéliums est très fortement diminué, voire nul, dans certains carcinomes invasifs.

C'est aussi dans la membrane plasmique que l'on trouve tous les systèmes de reconnaissance de surface. Ils ne seront pas étudiés en détail ici. Les plus connus sont les **marqueurs des groupes sanguins** (le système ABO), glycoprotéines et glycolipides présents sur la membrane plasmique des globules rouges. Leur spécificité est liée à des différences dans les séquences oligosaccharidiques des « antennes » émergeant sur la face extracytoplasmique de la membrane. C'est le cas aussi des familles d'**antigènes d'histocompatibilité** présents en surface des cellules, et dont on sait l'importance dans les phénomènes de rejet de greffes.

CHAPITRE II

Le territoire nucléaire. Le nucléoïde des Procaryotes et le noyau des Eucaryotes

Les deux formes cellulaires rencontrées chez les êtres vivants se distinguent, comme nous l'avons vu, par l'organisation du territoire nucléaire qui, généralement, occupe une position centrale. Chez les Eucaryotes, il est séparé du cytosol par une enveloppe, c'est le *noyau* ; chez les Procaryotes, il n'est pas limité, c'est un *nucléoïde*.

Chez tous les organismes cependant, l'information génétique est stockée, au niveau de molécules d'ADN, sous forme de séquences codées de nucléotides. L'évolution a toutefois, en favorisant l'augmentation de taille et la diversification des fonctions cellulaires, imposé la nécessité d'une information plus abondante et plus variée, c'est-à-dire des molécules d'ADN plus longues. Ainsi chez une bactérie de taille moyenne comme *Escherichia coli*, il y a, stockée dans le nucléoïde, une information correspondant à environ 1 800 gènes alors que celle contenue dans le noyau d'une cellule de mammifère est estimée entre 60 000 et 100 000 gènes. On conçoit qu'une telle augmentation de l'information disponible n'ait été possible que dans la mesure où les structures la contenant évoluaient parallèlement, autorisant notamment *l'utilisation immédiate de ces données* particulièrement nombreuses.

Ainsi, au niveau moléculaire *le principe du stockage* de l'information est identique, mais au niveau cellulaire les structures le réalisant sont différentes et aucune forme intermédiaire entre les deux modalités de répartition du matériel génétique n'est actuellement connue.

1. LE NUCLÉOÏDE DES CELLULES PROCARYOTES

1.1. ORGANISATION *IN SITU*

L'observation, en microscopie électronique, de coupes ultrafines réalisées dans des cellules procaryotes *(fig. II-1)* révèle dans la cellule une zone centrale plus claire que la zone périphérique, c'est *le nucléoïde* (N). Il paraît plus clair car, constitué par un enchevêtrement de fibrilles de 2 à 4 nm de diamètre en moyenne, il est plus facilement traversé par les électrons que le cytosol périphérique, particulièrement riche en ribosomes.

L'examen de coupes sériées montre que ce nucléoïde est toujours en contact, par une portion généralement très localisée de sa surface, avec la membrane plasmique ou, lorsqu'il existe, avec le dérivé de celle-ci, le mésosome.

Ce type de préparations ne permet pas toutefois de comprendre l'organisation spatiale du nucléoïde, notamment l'agencement du ou

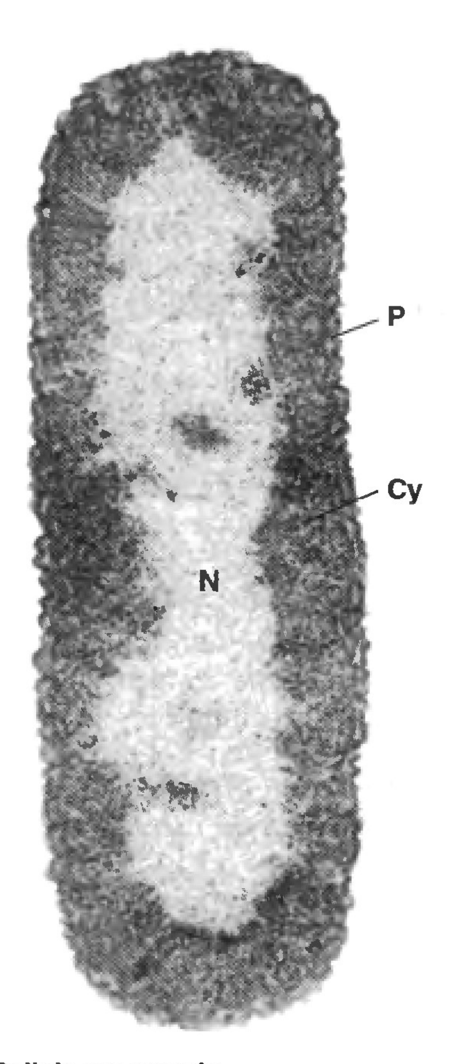


Fig. II-1 : Cellule procaryote.
Coupe ultrafine d'une bactérie, *Bacillus subtilis*, observée en microscopie électronique après fixation et coloration usuelles. À l'intérieur de la paroi (P), le cytoplasme (Cy) apparaît très dense car il est particulièrement riche en ribosomes. Le nucléoïde (N), à texture fibrillaire, est par contre beaucoup plus transparent aux électrons. G. x 40000.
(Cliché Pr. VIVIER, Institut Pasteur de Lille.)

des filaments qui le constituent. Ces derniers ont, en effet, un diamètre de 2 à 4 nm alors que les sections ultrafines réalisées ont une épaisseur comprise entre 80 et 100 nm ; il peut ainsi y avoir entre 20 et 50 éléments fibrillaires superposés dans l'épaisseur d'une seule coupe ; il est, dans ces conditions, impossible de déterminer les rapports établis entre les différents éléments constituant le nucléoïde. Ce sont donc d'autres méthodes, notamment celle faisant appel aux étalements moléculaires et celle ayant conduit à l'établissement de la carte génétique, qui ont permis de mieux en comprendre l'organisation.

1.2. LES CARTES GÉNÉTIQUES

La localisation des caractères héréditaires portés par l'ADN bactérien a été entreprise au cours des années 50 lorsque furent réalisées les premières expériences de transfert génétique chez les Procaryotes. Il apparut alors très rapidement que *les gènes étaient tous liés*, c'est-à-dire qu'ils étaient *situés sur un seul chromosome* qui, en conséquence, n'a ni début ni fin, donc sur une structure qui devait être ***circulaire***. D'autres interprétations furent cependant avancées et ce n'est que l'étude morphologique des molécules étalées qui permit de déterminer avec certitude la forme du chromosome.

1.3. LES ÉTALEMENTS MOLÉCULAIRES

Dans ces expériences, les premières ayant été réalisées par John CAIRNS au début des années 60, des bactéries sont cultivées pendant plusieurs générations dans un milieu contenant de la thymidine tritiée *(fig. II-2)*. Les synthèses cellulaires étant effectuées à partir de ce nucléotide, tout l'ADN est radioactif. Ces bactéries sont alors transférées dans un milieu sans thymidine radioactive, très concentré en substances nutritives, notamment en sucres qui ne sont pas aisément utilisés par la cellule, contenant, en outre, une enzyme hydrolytique, le *lysozyme,* qui détruit les constituants de la paroi bactérienne. Dans ce milieu particulier, où la pression osmotique est élevée, les cellules vont se rétracter par perte d'eau et les composants pariétaux vont être progressivement dégradés par l'enzyme. On obtient ainsi des cellules plus ou moins sphériques, dépourvues de paroi, ce sont des *protoplastes.*

Les bactéries sont alors transférées dans un tube contenant un milieu froid (c'est-à-dire non radioactif), à faible teneur en substances

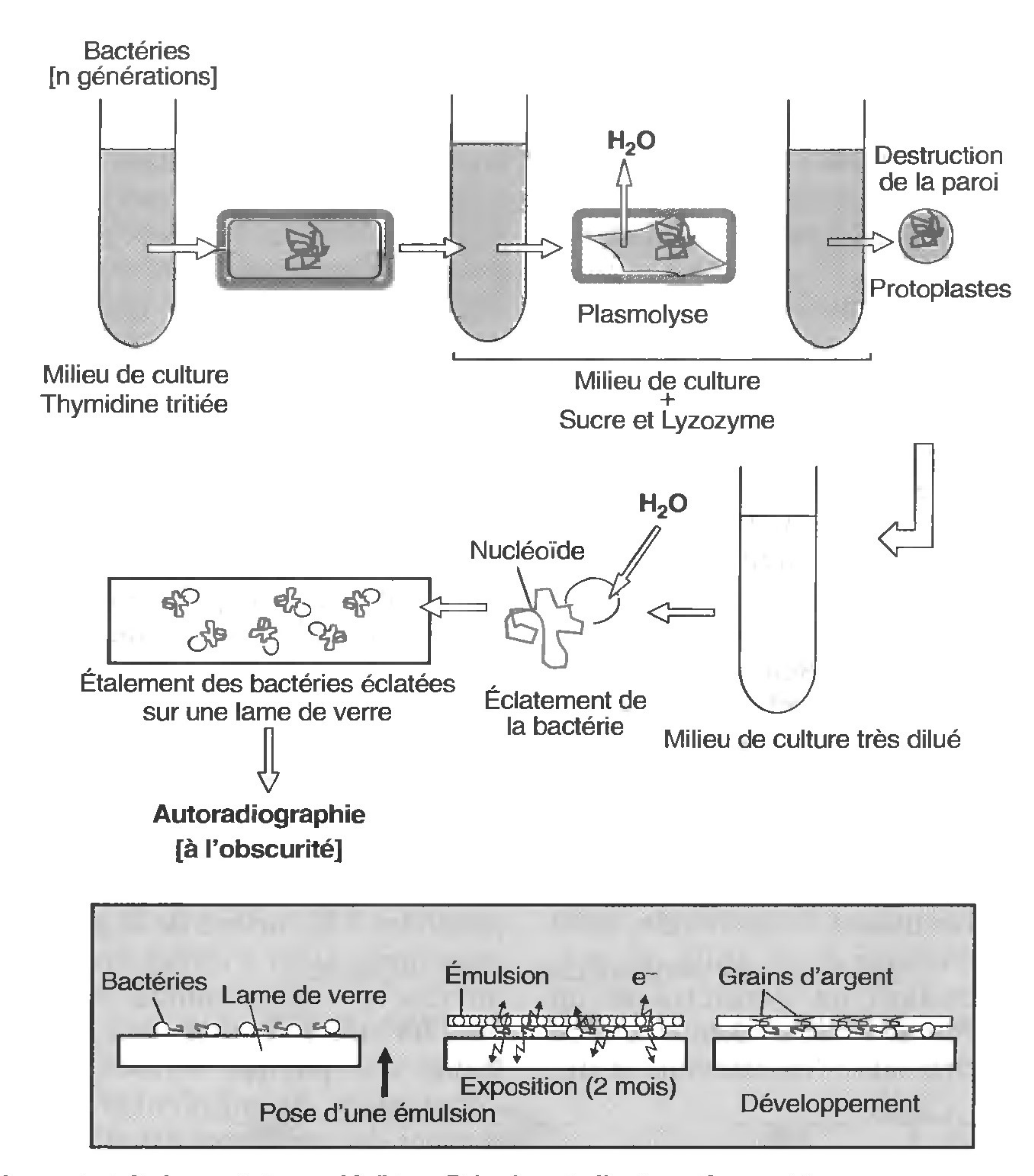


Fig. II-2 : Isolement et étalement de nucléoïdes. Principe de l'autoradiographie.
Les bactéries étant cultivées pendant de nombreuses générations sur un milieu contenant de la [^{3}H]-thymidine, leur ADN est entièrement radioactif. Après plasmolyse et désorganisation enzymatique de la paroi, on obtient des protoplastes qu'il est aisé de faire éclater en les plaçant dans un milieu hypotonique. Les nucléoïdes sont ainsi libérés et recueillis sur une lame de verre (étalement). La localisation des atomes de tritium intégrés dans l'ADN du nucléoïde est réalisée par autoradiographie : dépôt sur la lame, à l'obscurité, d'une émulsion photographique (gélatine contenant du bromure d'argent), puis exposition aux radiations émises, toujours à l'obscurité, durant plusieurs mois, enfin développement. Pendant l'exposition, les radiations β (électrons, e^-) émises par le tritium peuvent rencontrer un ion Ag^+ contenu dans un cristal de l'émulsion ; il y a formation d'une image latente. Après développement, le cristal exposé est transformé en grain d'argent insoluble tandis que les cristaux d'halogénure d'argent, non exposés, sont dissous. L'atome d'argent marque donc la présence sous-jacente d'un atome radioactif incorporé à l'ADN.

dissoutes et dépourvu d'enzyme. À la suite de ce changement, qui place les cellules dans un environnement très dilué par rapport aux concentrations cytosoliques, le flux d'eau entrant est très nettement supérieur au flux d'eau sortant et les bactéries vont augmenter de volume ; cette augmentation n'étant plus limitée par la paroi, le plasmalemme, étiré, se rompt et le contenu cellulaire, dont le nucléoïde, se répand dans le milieu. À partir de ce dernier, concentré par centrifugation, il est possible d'effectuer *un étalement sur lame* des nucléoïdes libérés ; à l'obscurité, cette préparation est recouverte par une émulsion sen-

sible aux radiations émises par le tritium, ce qui permet de réaliser une autoradiographie où les grains d'argent *marquent l'emplacement des molécules d'ADN sous-jacentes*, celles ayant incorporé la thymidine radioactive. ***Ces molécules apparaissent alors plus ou moins circulaires*** *(fig. II-3)*, très longues puisqu'elles atteignent plusieurs µm de long (plus de 1 500 µm pour celle constituant le chromosome d'*Escherichia coli*).

Cette première observation est effectuée en microscopie photonique mais il est possible d'en réaliser une comparable en microscopie électronique. Il n'est pas nécessaire alors d'utiliser les éléments radioactifs. Les bactéries préalablement cultivées sur milieu concentré, contenant du lysozyme, sont transférées dans un tube de milieu dilué au fond duquel se trouve une grille destinée aux observations en microscopie électronique, recouverte d'un film plastique *(fig. II-4)*. Les cellules éclatent et une centrifugation permet de recueillir les nucléoïdes sur la grille située au fond du tube.

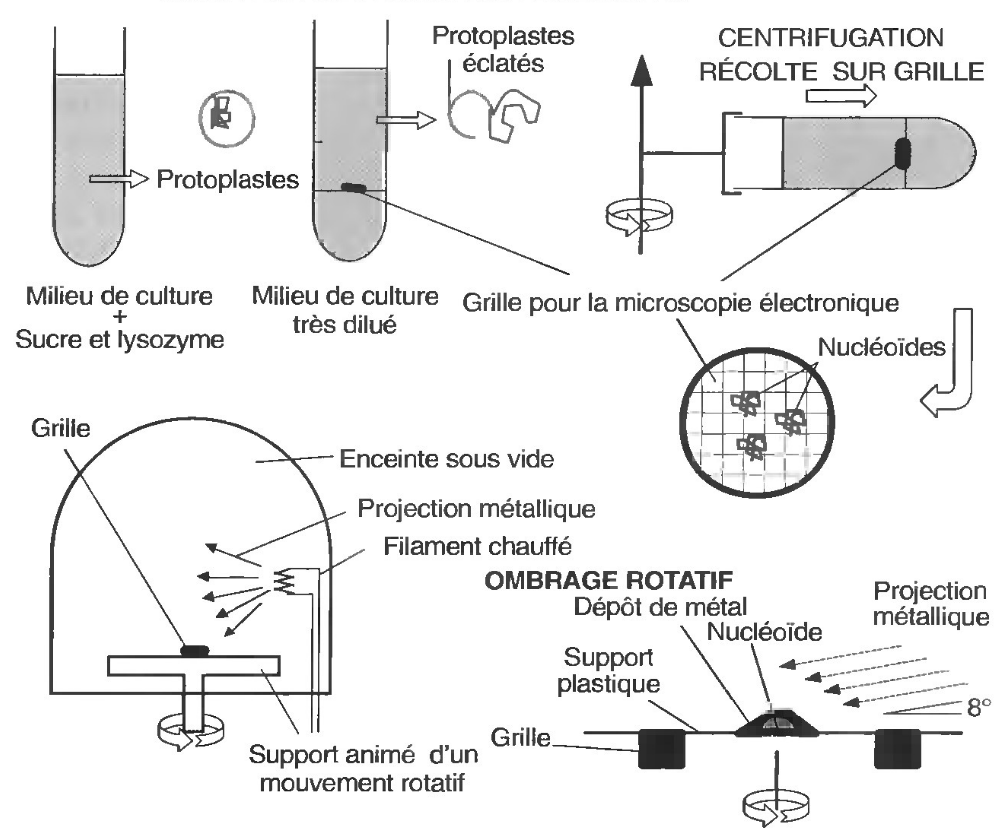
Le filament constituant le nucléoïde, étalé sur le support plastique de la grille, ne présente pas cependant un diamètre et un contraste suffisants pour être identifiable en microscopie électronique; les électrons le traversent trop aisément. Pour souligner le contour du filament, sans en modifier de manière trop importante les caractéristiques, on introduit la grille dans un évaporateur, enceinte à l'intérieur duquel est réalisé un vide poussé (10^{-4} mm de mercure) où l'on peut, par chauffage d'un filament, réaliser une pulvérisation métallique. Le filament utilisé est le plus souvent constitué par un mélange, carbone-platine par exemple; l'importance du dépôt étant directement proportionnelle à la durée pendant laquelle le filament est chauffé (0,2 nm par seconde dans des conditions standard), il est possible d'en contrôler l'épaisseur (chauffage de 45 secondes = dépôt de 9 nm). Désirant souligner le contour du filament observé, la pulvérisation métallique est effectuée *sous une incidence faible*, environ 8° par rapport à la surface de la grille et celle-ci est déposée sur *un support animé d'un mouvement rotatif*. Le métal s'accumule ainsi en quantité plus importante sur les faces redressées, qui sont heurtées de front par les atomes projetés, que sur les zones plus ou moins parallèles à la surface de la grille. Lorsque les structures ainsi traitées sont observées en microscopie électronique, les électrons sont plus fortement absorbés par les dépôts métalliques que par les régions essentiellement constituées de molécules organiques : le contour des structures est alors très fortement souligné; on parle d'***ombrage rotatif***. Cette technique permet la visualisation des complexes macromoléculaires; elle est actuellement très utilisée en biologie.



Fig. II-3 : Nucléoïde bactérien étalé.
Les grains d'argent, situés dans la gélatine (restes de l'émulsion) recouvrant les nucléoïdes étalés, marquent l'emplacement des atomes de [^{3}H]-thymidine sous-jacents (incorporés dans l'ADN bactérien); leur emplacement indique donc le contour du nucléoïde.

Les préparations obtenues après mise en œuvre de ces techniques d'étalement moléculaire montrent des bactéries éclatées, entourées par le chromosome formant de très nombreuses boucles *(fig. II-5)*. On ne note pas de discontinuités lorsque l'on suit ce filament de 2 nm à 4 nm de diamètre. *Il s'agit donc bien d'une structure circulaire, une boucle qui demeure souvent liée à la membrane plasmique.*

Les conditions dans lesquelles sont réalisés ces étalements influent cependant largement sur la structure du chromosome. En fonction de la concentration saline ou *lorsque le milieu expérimental est enrichi en molécules chargées*



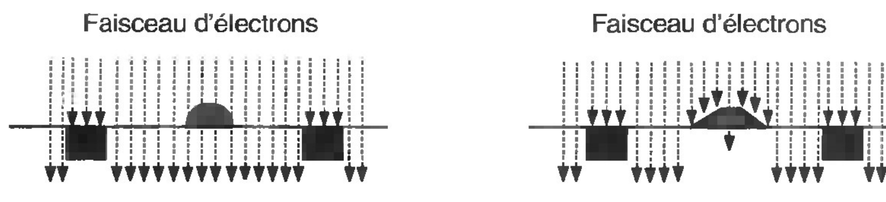


Fig. II-4 : Principe de l'étalement moléculaire et de l'ombrage rotatif.

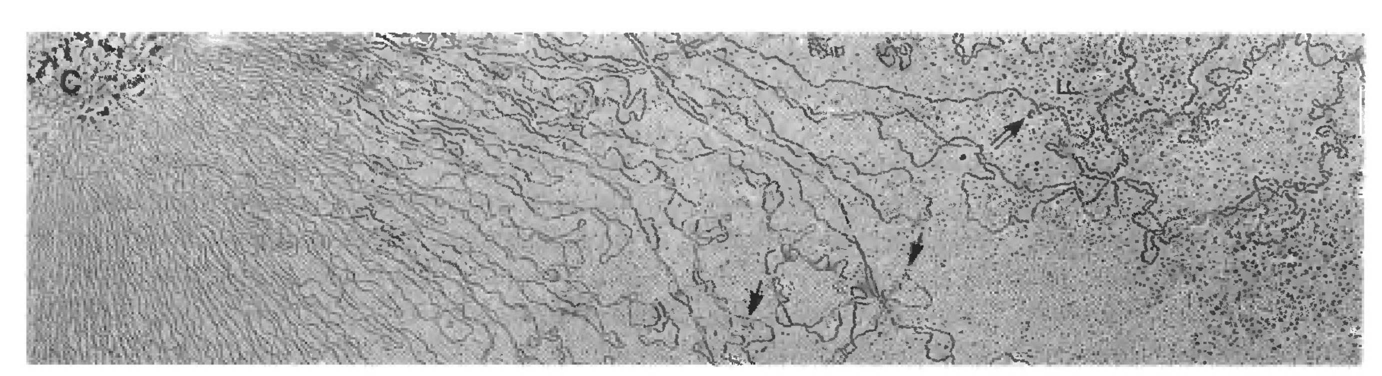


Fig. II-5 : Nucléoïde bactérien étalé, observé après ombrage rotatif.

Autour d'une partie centrale, constituant le cœur (C), l'ADN du nucléoïde est disposé en boucles plus ou moins largement déployées. En certains endroits (flèches) des structures condensées persistent. G. x 22 000.

(Reproduit de R. RAVENOFF et B. BOWEN. Electron microscopy of membrane-free folded chromosomes. Chromosoma 1976 ; 59 : 89-101.)

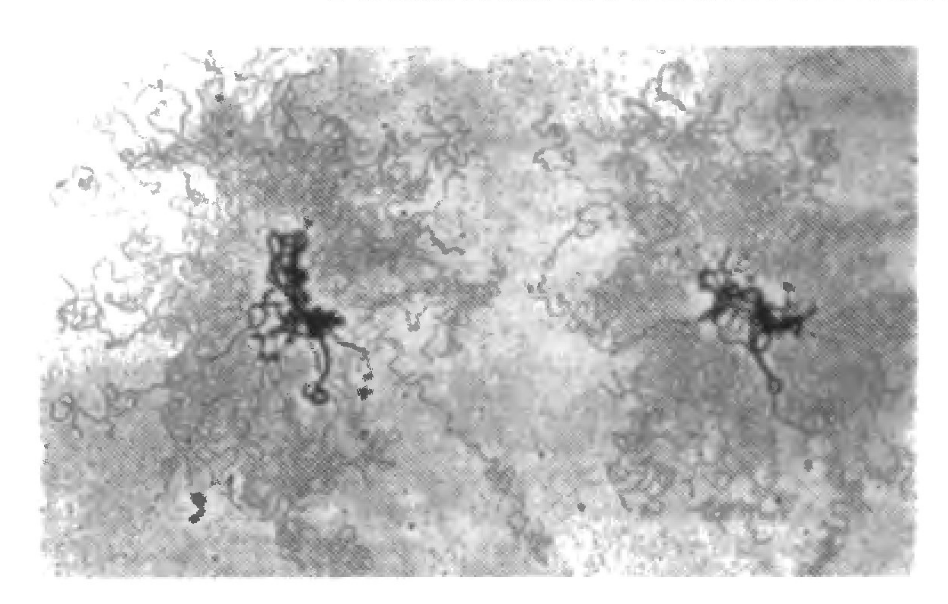


Fig. II-6 : Deux nucléoïdes bactériens incomplètement déployés.
G. x 10000.
(Reproduit de R. RAVENOFF et B. BOWEN. Electron microscopy of membrane-free folded chromosomes. Chromosoma 1976; 59: 89-101.)

positivement, polyamines à nombreux groupements NH_3^+ par exemple, le chromosome apparaît nettement moins étalé *(fig. II-6)* ; il se révèle constitué par une suite de boucles rayonnant autour d'une masse centrale dense. Il semble donc que, dans le nucléoïde, la molécule d'ADN est associée à d'autres molécules qui, neutralisant les charges négatives des groupements phosphate, permettent la réalisation d'une structure tertiaire.

1.4. COMPOSITION ET ARCHITECTURE MACROMOLÉCULAIRE

La taille des chromosomes bactériens est extrêmement variée ; les plus petits sont formés par 600 000 paires de nucléotides, soit 600 kilobases (600 kb) si l'on adopte la terminologie usuelle, alors que les plus importants en comportent environ 9 500 000, c'est-à-dire 9 500 kb.

Les petits chromosomes se rencontrent chez les bactéries de petite taille, dépourvues de parois, *les mycoplasmes* ; les plus volumineux sont observés chez les Procaryotes dont les cellules présentent des différenciations morphologiques ou des spores complexes. Il existe donc bien un rapport entre le nombre de gènes et la taille du chromosome.

Le chromosome est unique, c'est-à-dire que toute l'information génétique indispensable au développement de l'espèce est localisée sur une seule molécule circulaire d'ADN. Cependant la duplication est relativement indépendante de la bipartition cellulaire ; il peut y avoir plusieurs chromosomes dans un seul corps cellulaire ; *dans ce cas cependant, ils sont tous identiques, ce qui ne remet donc pas en cause l'unicité du support de l'information.* Quelques exceptions concernant cette règle de l'unicité ont été signalées mais elles demandent à être vérifiées.

À côté du chromosome il existe chez de très nombreuses bactéries *des éléments génétiques accessoires* dont les plus représentés sont ***les plasmides***. Ce sont des éléments génétiques caractérisés par *leur autonomie*, c'est-à-dire que leur duplication (et donc leur nombre) est indépendante de celle du chromosome, et par le fait qu'*ils ne sont pas indispensables.*

Ils portent des caractères qui confèrent à la cellule un avantage dans certaines situations, notamment lorsque surviennent des modifications de l'environnement. Les plus connus, car évidemment très importants pour les traitements médicaux, *sont les caractères de résistance aux antibiotiques* ; le plasmide est alors porteur d'une information codant pour la synthèse d'une enzyme capable de dégrader l'antibiotique. Ce peut être aussi la résistance aux métaux lourds (mercure, antimoine, plomb...), la sécrétion de substances à effet toxique pour d'autres bactéries... Lorsque le milieu est par contre favorable, ils deviennent un handicap pour la cellule qui les contient car les besoins énergétiques que nécessite leur duplication ralentissent la croissance ; les cel-

lules qui les portent sont donc progressivement éliminées dans les cultures.

Ces plasmides présentent une organisation comparable à celle du chromosome ; ce sont des molécules circulaires mais plus petites puisque leur taille est comprise entre 50 kb et quelques centaines de kilobases. Ils s'en distinguent car, d'une part, ce sont des éléments génétiques qui peuvent être éliminés totalement ou partiellement et, d'autre part, ***ils peuvent être transférés à une autre bactérie appartenant à une cellule de la même espèce*** ou à une espèce différente. On conçoit l'importance de ce dernier caractère lorsqu'il intéresse des bactéries, pathogènes ou non, portant un plasmide induisant la résistance aux antibiotiques qui peut être transféré dans des bactéries pathogènes mais non résistantes.

C'est actuellement un réel problème médical car sur un même plasmide peuvent être groupés des gènes de résistance différents qui seront transmis en bloc à d'autres bactéries. On connaît des souches multirésistantes de plusieurs bactéries pathogènes (staphylocoques, entérocoques, bacilles pyocyaniques...) **qui constituent désormais un risque majeur en milieu hospitalier où les infections, appelées infections nosocomiales (du grec *nosos*, maladie et *komeo*, soigner), sont souvent redoutables.**

Ces plasmides sont également des « outils » biologiques puisqu'on a appris dans les laboratoires à isoler ces molécules, à leur adjoindre une séquence d'ADN codant pour une protéine déterminée et à les réinsérer dans une bactérie à forte capacité de multiplication ; celle-ci, ayant ainsi acquis la capacité de synthétiser la protéine, pourra alors être utilisée pour la production d'une molécule complexe qu'il serait difficile ou trop onéreux de synthétiser par les méthodes chimiques traditionnelles. *Ces plasmides sont donc les éléments clefs de ce que l'on nomme actuellement le génie génétique.*

Si la molécule d'ADN du nucléoïde d'*Escherichia coli* (4700 kb) était sous forme étendue, elle atteindrait une longueur de 1560 µm (1,56 mm), ce qui représente environ 1000 fois la longueur de la cellule (comprise entre 1,5 et 2 µm). Il est donc exclu que ces molécules soient disposées sous la forme simple d'une double hélice nue (structure secondaire de cet acide nucléique) étalée dans le cytoplasme bactérien ; une organisation d'ordre supérieur doit être réalisée et celle-ci ne peut être obtenue à partir de l'ADN seul car *les charges négatives des phosphates*, en se repoussant, s'y opposent.

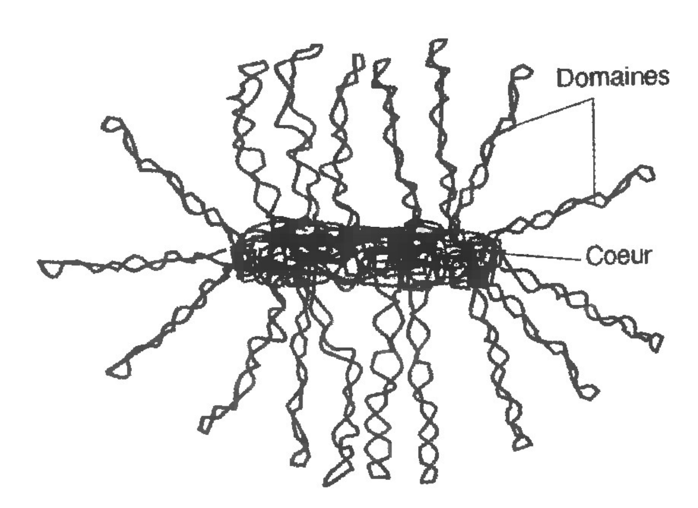


Fig. II-7 : Représentation schématique d'un nucléoïde bactérien.

Les étalements de chromosome bactérien, après rupture ménagée de la paroi et du plasmalemme, suggèrent une organisation en domaines décrivant des boucles autour d'un cœur central dense, disposition dite en « **marguerite** » *(fig. II-7)*. Pour comprendre cet agencement macromoléculaire, il convient, dans un premier temps, de déterminer quelles sont les molécules associées à l'ADN pour former le nucléoïde. Cette détermination est difficile pour plusieurs raisons :

– le nucléoïde n'étant pas limité par une enveloppe, il est très difficile de l'isoler sans entraîner des constituants cytosoliques, donc d'en connaître la composition exacte ;

– les molécules liées à l'ADN le sont par l'intermédiaire de liaisons faibles et sont donc partiellement extraites au moment de l'isolement du nucléoïde ;

– l'hydrolyse partielle des composants du nucléoïde, par des enzymes hydrolytiques du cytosol libérées au cours des manipulations, doit toujours être prise en compte.

La composition exacte du nucléoïde n'est donc pas encore précisément connue ; on sait toutefois que l'ADN y est associé à plusieurs types de protéines :

– des enzymes qui provoquent un surenroulement de la molécule d'ADN, les *topo-isomérases*, soit dans le même sens que l'enroulement des deux polynucléotides associés, c'est alors un surenroulement positif, soit dans le sens opposé, c'est alors un surenroulement négatif *(fig. II-8)*. Ce dernier est réalisé, avec utilisation d'ATP, par une catégorie de topo-isomérases, les ADN gyrases ; *favorisant l'ouverture de la double hélice*, il intervient dans les processus de duplication (synthèse d'une nouvelle molécule d'ADN, voir p. 367) ;

– des enzymes intervenant dans les processus de transcription (synthèse d'ARN messager, voir p. 199) dont les ARN polymérases, ou de duplication comme les ADN polymérases ;

– des protéines de structure, qui sont pour l'essentiel des *protéines basiques*, c'est-à-dire ***des protéines riches en acides aminés chargés positivement*** (arginine et lysine), capables d'établir des liaisons faibles avec les groupements phosphate de l'ADN. La plus connue de ces protéines est la protéine HU d'*Escherichia coli* qui comporte deux sous-unités dont la composition en aminoacides est très voisine ; elle forme avec l'ADN des structures globulaires de taille irrégulière, très instables et en perpétuel remaniement. On estime que, chez le colibacille, une faible partie de l'ADN (1/6) est associée à cette protéine. D'autres semblent également intervenir dans l'organisation du nucléoïde dont trois paraissent jouer un rôle important : H-NS *, HLPI, H ** ; on en découvrira vraisemblablement de nouvelles au cours des prochaines années.

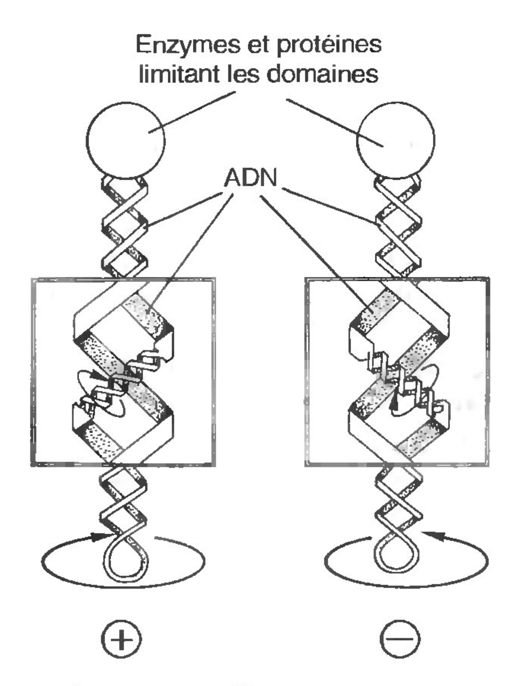


Fig. II-8 : ADN surenroulé.
La torsion peut être effectuée dans le même sens d'enroulement que la molécule d'ADN (visible dans la région encadrée), le surenroulement est alors positif ; si elle se produit en sens opposé, le surenroulement est négatif. Dans ce dernier cas les deux polynucléotides ont tendance à se séparer, notamment au niveau des séquences riches en adénine-thymine où la cohésion des deux brins est moins forte.

Il semble donc que les domaines de la molécule d'ADN formant des boucles autour du cœur, entre 50 et 100 par nucléoïde, soient délimités et maintenus sous forme surenroulée par des enzymes, ADN gyrases et topo-isomérases, le taux d'enroulement d'un domaine dépendant du rapport entre les enzymes ; cette conformation serait stabilisée par des protéines comme HU *(fig. II-9)*. On connaît mal l'organisation de la partie centrale, où d'autres protéines doivent intervenir.

Les méthodes immunocytochimiques permettent de localiser les enzymes et HU à la périphérie et non au centre du nucléoïde. Ceci suggère que l'ADN n'est pas dans un état stable mais au contraire dans un état mobile, les domaines étant en réorganisation permanente ; les portions d'acide nucléique transcrites seraient alors localisées au contact du cytosol riche en ribosomes. À cet endroit le degré de surenroulement pourrait être localement modifié par des changements dans l'environnement, ce qui facilite l'ouverture de la double hélice, notamment au niveau de régions riches en adénine et thymine (dont l'association est moins résistante puisqu'elles ne sont liées que par deux liaisons hydrogène), et rend possible la fixation des complexes enzymatiques de transcription.

De nombreuses autres formes d'organisation de la molécule d'ADN semblent exister dans

* Protéine neutre, ne comportant pas d'aminoacides basiques mais présentant malgré tout une grande affinité pour l'ADN.

** Très comparable à l'histone H_{2A} qui intervient dans la constitution des nucléosomes eucaryotes (voir p. 178).

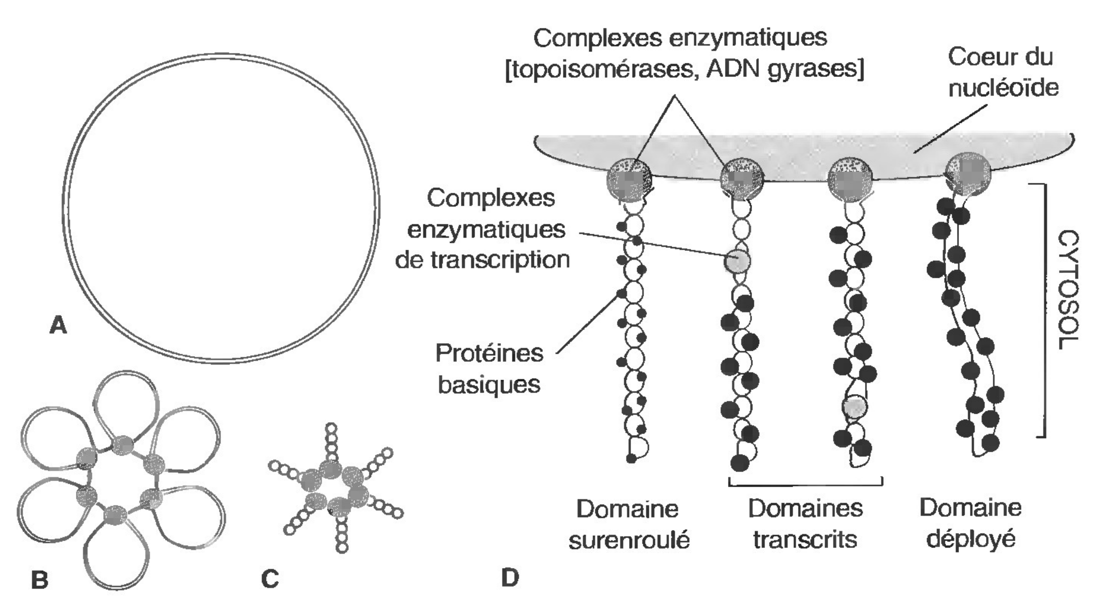


Fig. II-9 : Organisation du nucléoïde d'*Escherichia coli*.
A) Nucléoïde sous sa forme la plus étalée ; c'est une boucle d'ADN de 450 µm de diamètre environ.
B) Organisation en domaines par interactions localisées avec des protéines ; on a représenté 6 domaines sur ce schéma mais on estime qu'il y en a une cinquantaine ; la dimension est ainsi réduite à environ 50 µm.
C) Le superenroulement des domaines permet de réduire cette dimension à 1 µm.
D) Interprétation de l'organisation en domaines.

le nucléoïde : ADN sous forme Z, domaines de plusieurs centaines, voire plusieurs milliers, de paires de bases maintenus non surenroulés par fixation régulière de protéines interagissant les unes avec les autres. Leur rôle fonctionnel n'est pas encore clairement compris.

En conclusion, le nucléoïde *in vivo* apparaît comme une structure complexe, dans laquelle le surenroulement est un moteur conduisant à la mise en place de structures locales ayant une activité biologique particulière (transcription, duplication...).

2. LE NOYAU DES CELLULES EUCARYOTES

Le territoire nucléaire, chez les animaux et les végétaux, est toujours limité par une enveloppe, ce qui le rend aisément visible en microscopie photonique ; il fut donc identifié très tôt et, dès 1831, R. BROWN le reconnut comme *un constituant constant* de la cellule.

2.1. DONNÉES FOURNIES PAR LA MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Dans les cellules vivantes, le noyau apparaît comme une enclave plus réfringente que le cytoplasme.

Sur les coupes de matériel fixé, après coloration, on identifie dans le volume limité par l'enveloppe, au sein d'une substance fondamentale, le *nucléoplasme*, deux constituants : des granules en nombre variable (1 à 5 le plus souvent), ce sont les *nucléoles* ; un réseau de filaments très enchevêtrés, la *chromatine*, qui fut appelée ainsi car elle est très colorable par les colorants basiques *(fig. II-10)*.

À partir de ce schéma simple, on peut définir les principales variations rencontrées lorsqu'on étudie des cellules d'origine très différente.

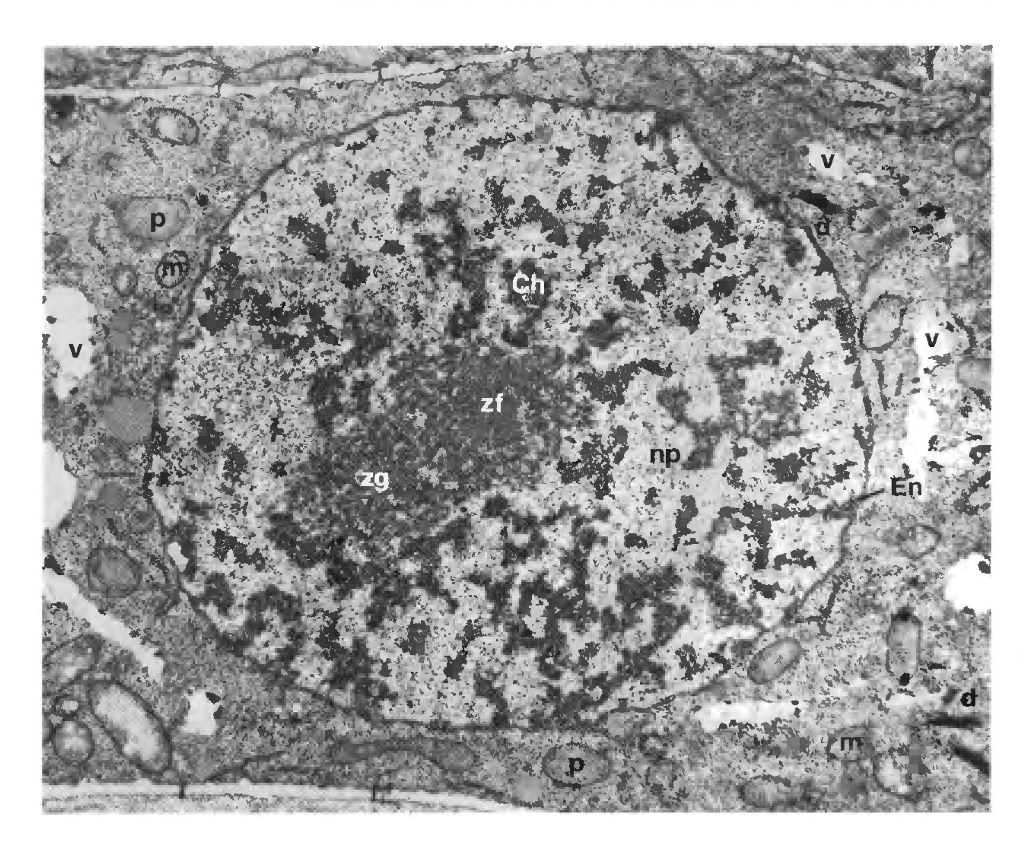


Fig. II-10 : Coupe ultrafine du noyau d'une cellule de racine de blé observée en microscopie électronique à transmission.
A l'intérieur du volume limité par l'enveloppe nucléaire (En), la chromatine (Ch) dessine un réseau plus ou moins régulier dans le nucléoplasme (np). Dans le nucléole, deux territoires sont bien distincts, la zone fibrillaire (zf) centrale et la zone granulaire (zg) périphérique. Dans le cytoplasme de cette cellule méristématique, on observe de nombreux organites : mitochondries (m), proplastes (p), très petites vacuoles (v), dictyosomes (d). Les parois sont minces et possèdent de nombreux plasmodesmes. G. x 13300.
(Cliché D. ROBERT.)

Le diamètre du noyau est, pour la plupart des cellules, compris entre 5 et 15 µm ; toutefois des organites plus petits se rencontrent par exemple chez les champignons, des plus volumineux dans les œufs de certaines espèces (*Cycas* entre autres).

Sa forme est généralement sphérique (c'est-à-dire circulaire sur les sections), mais il peut être fusiforme dans les cellules musculaires, discoïde dans les cellules d'épithélium pavimenteux, ellipsoïdal dans les cellules végétales parenchymateuses, plurilobé dans les leucocytes dits polynucléaires (granulocytes). En fait, cette forme dépend de celle de la cellule (la cellule musculaire est fusiforme ; les cellules de l'épithélium pavimenteux, aplaties), du volume occupé par les autres organites (dans les cellules végétales, la volumineuse vacuole repousse le noyau contre la paroi) et de l'activité cellulaire (dans les cellules très actives, le contour nucléaire est irrégulier).

Les cellules contiennent généralement un seul noyau mais très fréquemment on en observe plusieurs dans un cytoplasme indivis. Lorsque cette forme d'organisation est permanente, la structure n'est plus cellulaire, elle est cœnocytique ou syncytiale ; on ne parle plus de cellule mais de *cœnocyte* ou de *syncytium*. Cette forme d'organisation est caractéristique de certains tissus, le tissu musculaire strié par exemple, ou de certains organismes dans leur totalité, comme certaines algues ou certains champignons *(fig. II-11)*.

La répartition de la chromatine varie sensiblement d'un organisme à l'autre ; elle peut apparaître sous forme d'un réseau régulier occupant la totalité du volume nucléaire avec ou non des régions plus denses, comme une très fine couche accolée à l'enveloppe nucléaire, ou au contraire en masses bien déli-

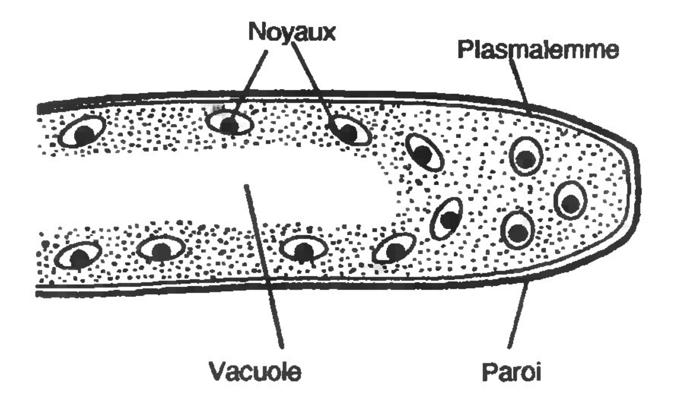


Fig. II-11 : Organisation cœnocytique (ou siphonnée) chez un Champignon.

mitées. Ces variations correspondent à des degrés de condensation différents ; ils sont souvent caractéristiques d'une espèce ou d'un type cellulaire *(fig. II-12)*.

L'aspect du noyau change au cours du temps ; au moment de la division cellulaire, il y a disparition de l'enveloppe nucléaire et condensation progressive de la chromatine en structures de forme déterminée (sphère, bâtonnet rectiligne ou en V), **les chromosomes**. Ceux-ci disparaissent en fin de division tandis que le réseau chromatinien se reforme. Comme ces chromosomes réapparaissent à chaque division, que leur nombre et leur forme restent identiques pour une espèce donnée, il apparut dès 1880 que ***chromatine et chromosomes étaient deux aspects de la même entité***, c'est-à-dire que les chromosomes persistent entre les divisions, pendant l'interphase. Le réseau de chromatine correspond donc à l'ensemble des chromosomes enchevêtrés, sous forme étendue. *Le chromosome interphasique est la forme décondensée.*

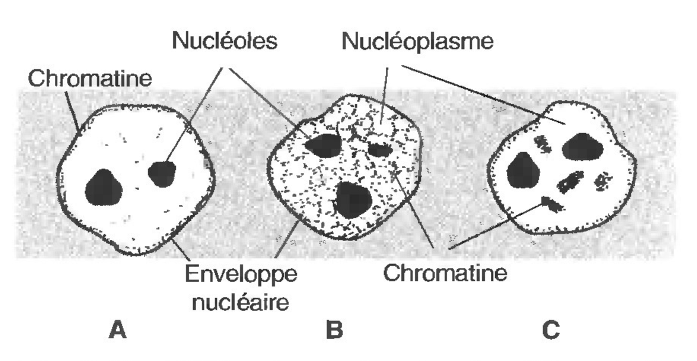


Fig. II-12 : Différents modes de répartition de la chromatine dans les noyaux observés en microscopie photonique sur des coupes fines colorées.

2.2. ULTRASTRUCTURE DU NOYAU INTERPHASIQUE

L'avènement de la microscopie électronique a permis d'affiner considérablement la représentation du noyau cellulaire *(fig. II-13)*, même si les méthodes de fixation usuelles, employées pour préparer le matériel aux observations, sont moins favorables à l'étude de ce compartiment qu'à celle du cytoplasme.

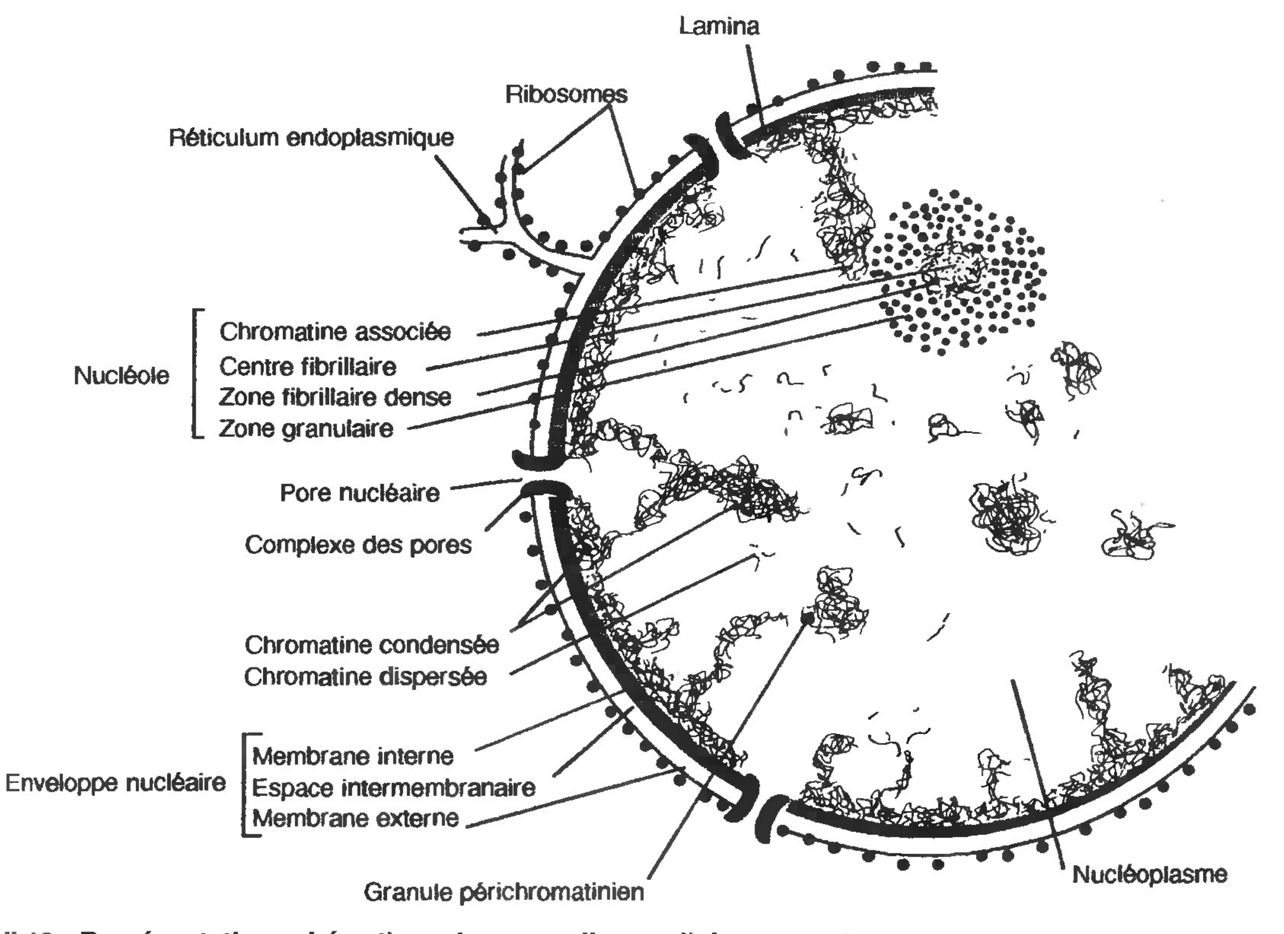


Fig. II-13 : Représentation schématique du noyau d'une cellule eucaryote.

Les techniques de fractionnement ont en outre permis de déterminer la composition des différents constituants nucléaires *(tableau II-1)*.

Le noyau est limité par **une enveloppe** formée par deux membranes distinctes de 6 à 7 nm d'épaisseur, chacune constituée par une mosaïque lipoprotéique comparable à celle du plasmalemme ; *la membrane externe*, recouverte de ribosomes, est en continuité avec les membranes du réticulum endoplasmique dont elle paraît n'être qu'une différenciation ; *la membrane interne* est séparée de la chromatine par une couche fibrillaire généralement très fine, *la lamina* ; membranes externe et interne, séparées par *un espace intermembranaire* d'importance variable, sont en continuité au niveau de *pores* qui mettent en communication le cytoplasme et le nucléoplasme ; au niveau de ces pores des structures protéiques forment *le complexe du pore*.

La chromatine apparaît constituée par des fibrilles, de 11 à 30 nm de diamètre, à contour très sinueux, qui sont donc très rarement parallèles au plan des sections, ce qui donne à l'ensemble un aspect granuleux. La chromatine est plus ou moins dense selon les territoires nucléaires, ce qui permet d'en distinguer deux formes, *la chromatine dispersée*, où les fibrilles constitutives sont bien séparées les unes des autres, et *la chromatine condensée* où elles sont étroitement enchevêtrées ; c'est cette chromatine condensée qui est identifiable après coloration en microscopie photonique. Les analyses biochimiques et les réactions cytochimiques (réaction de Feulgen) indiquent que la chromatine est essentiellement constituée d'ADN et de protéines ; c'est donc à son niveau que se trouve stockée l'information génétique cellulaire.

Le ou les nucléoles sont moins régulièrement sphériques que sur les préparations observées en microscopie photonique ; ils ne sont pas, en effet, limités par une membrane. Leur organisation est très variable : elle diffère d'un type cellulaire à l'autre, et dans une même cellule évolue au cours du temps. Les variations portent sur l'importance relative et la répartition des deux régions que l'on distingue habituellement dans un nucléole. *La zone granulaire*, généralement périphérique, est constituée par l'association plus ou moins étroite de particules très denses ; *la zone fibrillaire* est formée par l'association de fines fibrilles qui se répartissent entre un centre fibrillaire, très transparent aux électrons, et une composante fibrillaire dense séparant le centre de la zone granulaire. Les nucléoles sont généralement localisés au contact d'une masse plus ou moins importante de chromatine condensée, la chromatine associée.

Les analyses biochimiques, comme les méthodes histochimiques, montrent que le nucléole est constitué de protéines, d'ADN et d'ARN ; c'est en effet le territoire nucléaire où sont synthétisés les ribosomes. Son organisation sera mieux comprise lorsque la transcription des ARN ribosomaux aura été étudiée (voir p. 215).

Le nucléoplasme, substance fondamentale du noyau dans laquelle se répartissent chromatine et nucléoles, est transparent aux électrons ; on y observe souvent des granules denses que l'on définit, suivant leur localisa-

TABLEAU II-1

Principe du fractionnement nucléaire (méthode simplifiée)

Broyage du tissu à 0 °C (milieu tamponné saccharosé enrichi en Ca^{2+} et Mg^{2+}) Broyat centrifugé (150 g x 15 min) → Culot de noyaux
↓
Culot de noyaux remis en suspension dans un milieu dilué additionné d'EDTA * → Rupture de l'enveloppe nucléaire
↓
Centrifugation de la suspension (1 000 g x 20 min) → Culot de nucléoles
↓
Le surnageant est récupéré puis centrifugé (5 000 g x 30 min) → Culot de chromatine
↓
Le surnageant est récupéré puis centrifugé (100 000 g x 120 min) → Culot formé par la lamina, le complexe des pores

* Ethylène Diamine Tétra-Acétate.

tion, comme granules péri ou interchromatiniens. Le nucléoplasme, milieu d'échanges, présente une composition très complexe ; on y trouve en solution les précurseurs indispensables aux synthèses nucléaires (ribonucléotides et désoxyribonucléotides), des ions (Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}...), des enzymes intervenant dans les processus de transcription et de duplication (ARN polymérases, ADN polymérases, déroulase...), des protéines venant du cytoplasme pour s'associer à l'ADN (histones), à l'ARN (protéines ribosomales) ou jouant un rôle régulateur (facteurs de transcription...). La composition du nucléoplasme est donc très variable puisqu'elle dépend essentiellement des activités nucléaires au moment où est réalisée l'analyse.

2.3. LA CHROMATINE

La chromatine est le composant nucléaire majeur ; elle est constituée par un enchevêtrement de filaments, le réseau chromatinien ; ces filaments correspondent, nous l'avons vu, à la forme la plus décondensée des chromosomes.

A. *Composition*

Le filament chromatinien, ou **chromosome interphasique**, est un assemblage moléculaire complexe dans lequel l'ADN, support de l'information génétique, est associé à des protéines diverses, jouant un rôle structural ou fonctionnel.

a. L'ADN

La quantité d'ADN contenue dans le noyau d'une cellule eucaryote est infiniment plus grande que celle intervenant dans la constitution du nucléoïde procaryote. Chez l'homme, par exemple, l'ADN contenu dans une cellule somatique banale correspond à l'enchaînement de 6.10^9 paires de bases, ce qui représenterait, si tous les nucléotides étaient disposés les uns à la suite des autres, une longueur de deux mètres environ. En réalité, dans le génome humain, cet ADN est divisé en 46 unités, chacune correspondant à *un chromosome (fig. II-14)*. Dans les cellules reproductrices, ce nombre est réduit de moitié : il y a alors 23 chromosomes ; on dit que ces cellules sont *haploïdes*. Au moment de la fécondation, une cellule reproductrice paternelle (le gamète mâle ou spermatozoïde) s'unit à une cellule reproductrice maternelle (le gamète femelle ou ovule) pour former l'œuf ou zygote ; celui-ci contient alors 46 chromosomes, il est *diploïde* ; toutes les cellules constituant l'organisme adulte provenant de la division de ce zygote auront la même constitution chromosomique.

Des méthodes diverses ont permis de montrer que, dans un chromosome interphasique en période de présynthèse (voir p. 383), l'ADN se trouve sous forme d'une seule double hélice, c'est-à-dire qu'il correspond à une seule macromolécule ; il y a donc 23 ou 24 molécules différentes dans une cellule humaine suivant le sexe, puisque 22 chromosomes sont toujours représentés en double exemplaire, ce sont les autosomes (un d'origine maternelle, l'autre d'origine paternelle) et deux chromosomes sexuels *(fig. II-14, B)* qui sont identiques chez la femme (XX, qui a donc 23 molécules distinctes dans son génome), différents chez l'homme (XY, ce qui porte à 24 le nombre des types moléculaires).

La quantité d'ADN dans une cellule diploïde est constante pour une espèce mais elle varie considérablement d'un organisme à l'autre : environ 2.10^{10} pb chez le triton et le haricot, 9.10^{10} pb chez le lis, entre 2.10^7 et 1.10^8 pb chez les champignons par exemple.

La quantité d'ADN contenue dans une cellule eucaryote est donc beaucoup plus importante que celle intégrée au nucléoïde procaryote (2 m d'ADN chez l'homme, 1,4 mm chez le colibacille) et on peut s'interroger sur la signification de cette différence. Les cinétiques de renaturation apportent dans ce domaine quelques informations.

Nous avons vu (p. 124) qu'il est possible de séparer, par chauffage, les deux polynucléotides constituant la molécule d'ADN, *c'est la dénaturation*, et que ces deux polynucléotides peuvent se réassocier, *c'est la renaturation*, si le refroidissement qui suit est lent. Cette renaturation dépend du pourcentage de collisions



Fig. II-14 : Caryotype humain.
À partir de micrographies de cellules en métaphase (A), les chromosomes ont été identifiés, séparés et regroupés par paires (B). Chaque chromosome à ce stade de la division est constitué par deux chromatides réunies au niveau du centromère, d'où les formes en X généralement rencontrées. Les chromosomes sexuels sont identiques, ce sont deux X, l'individu à partir duquel le caryotype a été établi était donc de sexe féminin (N, noyaux interphasiques).
(D'après un document de F. BRIZARD, Laboratoire d'hématologie et maladies du sang. CHU de Poitiers.)

entre brins complémentaires ; plus ceux-ci sont nombreux, plus rapide sera la réassociation. L'ADN de virus ou de bactéries, constitué par une séquence relativement courte, donne après fractionnement un petit nombre de segments nucléotidiques différents ; après dénaturation, ceux-ci se renaturent rapidement, d'une manière simple *(fig. II-15)*.

L'ADN des cellules eucaryotes, préalablement coupé en segments polynucléotidiques relativement courts (1 000 paires de bases), présente une cinétique plus complexe où l'on peut distinguer des fragments à réassociation rapide (ceux qui figurent en grand nombre) et des fragments à réassociation lente (ceux qui sont moins bien représentés dans le mélange):

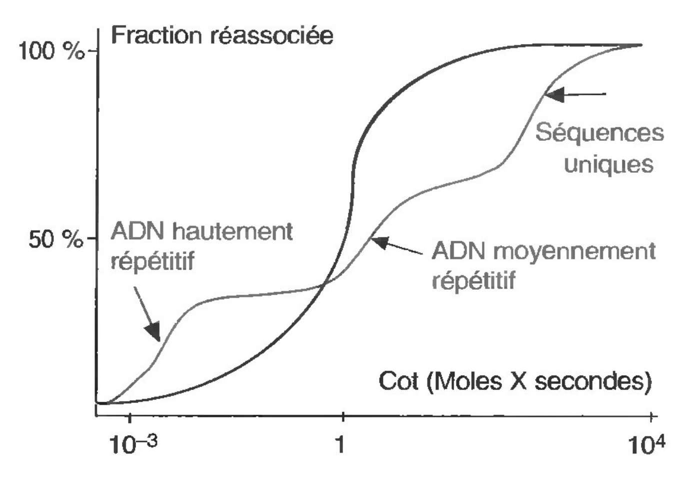


Fig. II-15 : Cinétique de renaturation de l'ADN d'Escherichia coli (en noir) et d'ADN de cellules de mammifère (en rouge).

Le Cot, produit de la concentration initiale en ADN par le temps d'incubation, permet de comparer des expériences de réassociation réalisées avec des concentrations en ADN différentes : une solution contenant une forte concentration en ADN et incubée pendant un temps court aura le même Cot qu'une solution où la concentration du même ADN sera faible mais le temps d'incubation long ; elles auront le même pourcentage de renaturation. Il est ainsi possible de comparer des ADN d'origine et d'importance très différentes. Dans l'expérience ci-dessus, la comparaison montre une cinétique simple pour l'ADN bactérien alors que celle complexe de l'eucaryote révèle la présence de populations d'ADN quantitativement très différentes.

c'est un ADN hétérogène. Une analyse plus précise des courbes de dénaturation obtenues permet de distinguer trois fractions :

– une première constituée de séquences relativement courtes (10 à 200 paires de bases), à renaturation très rapide, qui existent en plusieurs centaines de milliers, voire de millions, d'exemplaires dans le génome ; elle forme ***l'ADN hautement répétitif*** (15 à 20 % du génome) ;

– une deuxième à renaturation relativement rapide est représentée par quelques centaines ou quelques milliers de copies, c'est ***l'ADN moyennement répétitif*** (30 à 35 % du génome) ;

– une troisième est formée par ***des séquences uniques*** ou faiblement répétées ; dans ces conditions, la probabilité de collision entre les polynucléotides séparés est faible, la renaturation est donc lente (50 % du génome).

L'ADN hautement répétitif n'est pas transcrit et, dans le noyau interphasique, il forme en partie la chromatine restant toujours sous forme condensée (hétérochromatine). Cet ADN est abondant dans certaines régions du chromosome : aux deux extrémités (télomères) où il stabilise la molécule linéaire (voir p. 375) et dans la partie, souvent centrale, le centromère, où il contribue vraisemblablement à maintenir associées les chromatides sœurs en début de mitose (voir p. 389). La quantité d'ADN hautement répétitif varie très sensiblement d'une espèce à l'autre (60 % chez certaines, moins de 15 % chez d'autres) sans que l'on en connaisse très exactement la signification.

L'ADN moyennement répétitif correspond pour une partie à des séquences non transcrites, pour l'autre partie à des gènes dont il existe plusieurs centaines de copies ; ceux codant pour l'actine, les histones, les ARN ribosomiques appartiennent à cette catégorie.

C'est dans *l'ADN formé de séquences uniques* (en réalité en double exemplaires dans une cellule diploïde) que se situent les gènes codant pour la plupart des protéines. En fait le génome des mammifères contient suffisamment d'ADN pour coder 3 millions de protéines, mais dans les cellules d'un organisme on estime qu'il n'y en a pas plus de 60000 différentes. **Il y a donc chez les Eucaryotes un excès d'information disponible** dont on ne connaît pas encore très exactement la fonction.

b. Les protéines

Elles sont de deux sortes dans la chromatine : un premier groupe très homogène est formé par un nombre restreint de types moléculaires (5) se caractérisant par leur caractère basique, ce sont ***les histones*** ; un second groupe est constitué de protéines chimiquement et physiologiquement très diverses (rôles enzymatique, structural, régulateur, etc.) ce qui conduit à les distinguer des précédentes de manière négative en les nommant ***protéines non-histones***.

Les histones sont des protéines de petite taille, dont la masse moléculaire est comprise entre 10000 et 20000 daltons. L'analyse globale montre qu'***elles sont particulièrement riches en deux acides aminés basiques : la lysine et l'arginine***.

$$NH_3^+ - (CH_2)_4 - CH(NH_3^+) - COO^-$$

Lysine

$$H_2N - C(=NH_2^+) - NH - (CH_2)_3 - CH(NH_3^+) - COO^-$$

Arginine

Ce sont des protéines qui présentent une charge positive relativement importante; il est donc possible de les séparer par électrophorèse (*fig. II-16*).

Placées dans un milieu donneur de protons (acide) les radicaux d'acides aminés vont être chargés positivement; dans un champ électrique, les protéines vont se déplacer vers la cathode à une vitesse qui sera proportionnelle à leur charge d'une part, à leur encombrement d'autre part. En effet, comme nous l'avons vu (p. 65), le mouvement des molécules dans les mailles du gel est ralenti par les frottements; leur migration sera en conséquence freinée si les mailles du réseau sont petites et si le volume moléculaire est important. On peut ainsi séparer aisément les protéines histones en fonction de leur teneur en aminoacides basiques.

À partir d'un extrait brut d'histones, on obtient ainsi 5 fractions différentes (fig. II-17).

Les histones sont, comme nous l'avons vu (p. 52), des molécules globulaires possédant une région centrale hydrophobe et des extrémités N et C terminales, riches en aminoacides polaires et chargées, très largement étalées dans le milieu aqueux.

Rappelons que l'un des faits qui doit être souligné concerne *la stabilité de la séquence de ces protéines*; celle-ci varie extrêmement peu chez les différents Eucaryotes; l'exemple le plus classique est celui de l'histone H_4 qui est toujours constituée par 102 aminoacides: celle du thymus de veau et celle du petit pois ne diffèrent que par 2 acides aminés. Bien entendu d'autres mutations ont dû se produire au cours de l'évolution; si on n'en retrouve pas trace chez les espèces actuelles, c'est qu'elles sont létales, c'est-à-dire qu'elles entraînent la mort de l'organisme chez qui elles se produisent; compte tenu de nos connaissances sur l'architecture des protéines, ceci suppose que presque tous les acides aminés jouent un rôle important; *la moindre modification entraîne un changement de forme qui rend la molécule inapte à jouer son rôle.*

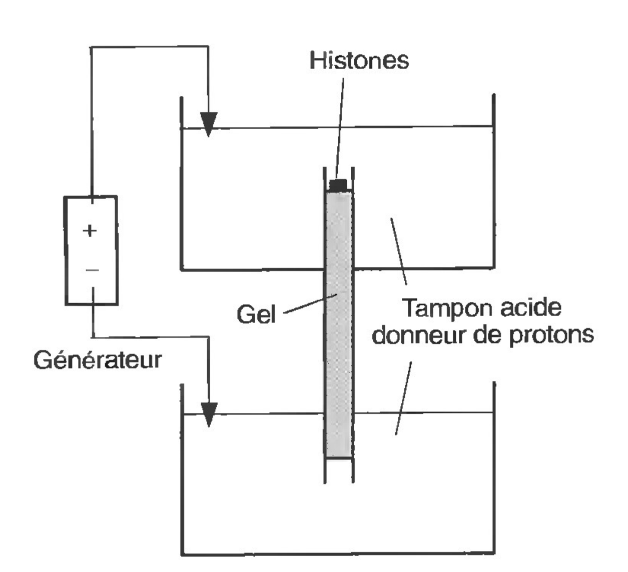


Fig. II-16: Électrophorèse verticale d'histones extraites des noyaux.

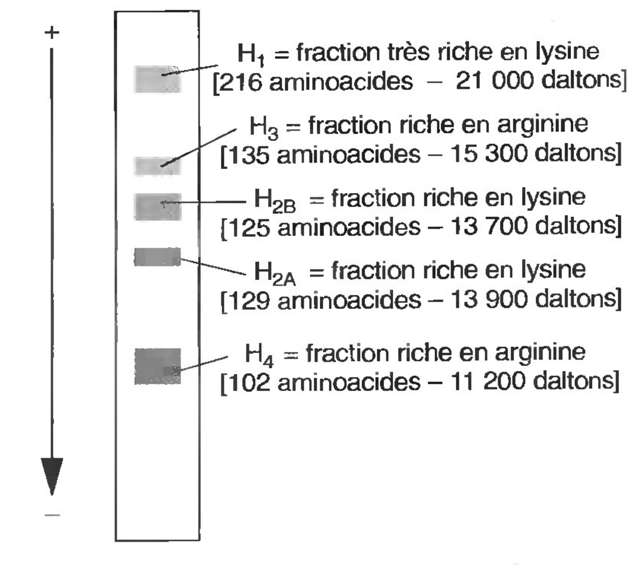


Fig. II-17: Après migration, les histones se répartissent en cinq bandes.

B. *Architecture moléculaire de la chromatine*

La connaissance de cette architecture est indispensable pour comprendre les modalités du transfert de l'information dans la cellule et pour interpréter l'organisation du noyau interphasique et celle des chromosomes mitotiques. Nos conceptions actuelles découlent d'un ensemble de données expérimentales obtenues au cours des années 1960-1970.

a. *Données expérimentales*

Analyse par diffraction des rayons X. C'est une méthode complexe qui permet l'étude des structures ordonnées, notamment la disposition régulière des atomes et molécules dans l'espace et leur organisation en un réseau à trois dimensions (cf. cristaux).

En 1959, WILKINS et LUZZATI montrèrent que la chromatine a une structure périodique qui, sans être aussi ordonnée que dans un cristal, se caractérise par une répétition des mêmes agencements moléculaires à intervalles réguliers, l'unité répétitive revenant tous les 10 nm environ. Le même résultat est obtenu avec un mélange *in vitro* d'ADN et d'histones, il n'apparaît pas avec l'ADN seul ou les histones seules. **La structure périodique est donc introduite par l'association des histones et de l'ADN.**

Action des nucléases. Dans les années 1960, on isola deux types de désoxyribonucléases :

– *les endonucléases* qui reconnaissent des séquences de nucléotides sur les deux brins constituant la molécule d'ADN et coupent à ce niveau, en un point qui est donc plus ou moins éloigné de l'extrémité de la double hélice. Elles dégradent la molécule d'ADN en oligonucléotides (voir encadré) ;

– *les exonucléases* au contraire dégradent la molécule de manière séquentielle, en partant d'une extrémité et en détachant nucléotide après nucléotide.

Première expérience : De la chromatine isolée est traitée par une endonucléase (nucléase de microcoque par exemple) pendant un temps très bref. Les fragments de chromatine obtenus sont ensuite séparés par centrifugation sur gradient de densité. On identifie ainsi plusieurs fractions que l'on peut isoler. Pour chaque fraction on détermine, par électrophorèse, la longueur du polynucléotide et la nature des protéines qui lui sont associées *(fig. II-18).*

On peut, conclure, après cette première expérience, que **la nucléase coupe le filament de chromatine à intervalles réguliers, séparés par environ 200 pb ou un multiple de 200 pb.**

Seconde expérience : La chromatine isolée est traitée par la même endonucléase que dans l'expérience précédente, mais les protéines et l'ADN sont d'abord séparés. On détermine alors la nature des protéines et la longueur des fragments d'ADN après l'action enzymatique *(fig. II-19).*

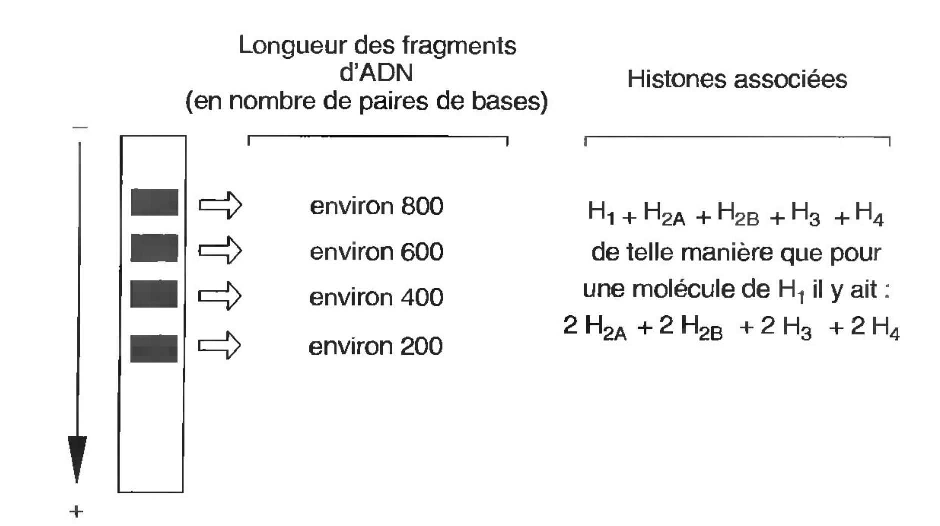


Fig. II-18 : Répartition des fragments chromatiniens après un traitement bref par une endonucléase et composition, en ADN et protéines, de chacun de ces fragments.

LES ENZYMES DE RESTRICTION – LES CARTES DE RESTRICTION*

Ce sont des endonucléases bactériennes qui détruisent l'ADN de certains bactériophages ; elles restreignent l'infectivité de ces virus vis-à-vis de certaines souches d'où le nom qui leur a été donné. *C'est un processus de défense propre aux Procaryotes* ; il n'y a pas de mécanisme équivalent connu chez les Eucaryotes.

Elles coupent la molécule d'ADN d'un phage donné (ou un ADN d'autre origine) en fragments de longueurs toujours identiques comme on peut le constater en séparant ces fragments par électrophorèse. Ce morcellement dépend, d'une part, de l'ADN (viral ou autre), donc de la séquence de nucléotides le constituant et, d'autre part, de l'enzyme utilisée.

En effet, on a isolé plusieurs centaines de ces enzymes de restriction et une nomenclature particulière a été adoptée pour les identifier. Une première lettre écrite en majuscule correspond à l'initiale du genre de la bactérie ; les deux lettres minuscules suivantes identifient l'espèce ; une nouvelle majuscule permet, si c'est nécessaire, de caractériser la souche bactérienne utilisée ; un chiffre romain précise le numéro d'ordre de découverte de l'enzyme. On peut prendre pour exemple une enzyme très utilisée :

EcoRI
E*scherichia* ***co****li* souche **R**y13, 1re enzyme trouvée chez le colibacille

Chacune de ces enzymes coupe l'ADN en un point précis, ***son site de restriction***, qui correspond à une *séquence reconnue*, dont la longueur est comprise entre 4 et 8 paires de bases, et dont la caractéristique essentielle est d'être palindromique (c'est-à-dire que la séquence est identique sur les deux brins quand elle est lue dans le sens 5'→3').

Site reconnu par EcoRI : $^{5'}$GAATTC$^{3'}$ / $^{3'}$CTTAAG$^{5'}$ Site reconnu par HpaI : $^{5'}$GTTAAC$^{3'}$ / $^{3'}$CAATTG$^{5'}$

Il existe 3 types principaux d'enzymes : les types I et III reconnaissent la séquence mais coupent les liaisons phosphodiester de la molécule en un point différent de cette séquence ; celles de type II coupent l'ADN au niveau du site identifié ; ce sont ces dernières qui sont utilisées par les biologistes.

Il existe deux modes de coupure.

Dans le premier, les deux brins sont coupés au même niveau ; c'est ce qui se produit avec HpaI :

↓ $^{5'}$GTTAAC$^{3'}$ $^{3'}$CAATTG$^{5'}$ ↑	*coupure par HpaI* →	$^{5'}$GTT$^{3'}$ $^{3'}$CAA$^{5'}$	$^{5'}$AAC$^{3'}$ $^{3'}$TTG$^{5'}$

les coupures sont dites à *bouts francs*.

Dans le second mode, les coupures sont décalées sur les deux brins : c'est ce qui se produit avec EcoRI :

↓ $^{5'}$GAATTC$^{3'}$ $^{3'}$CTTAAG$^{5'}$ ↑	*coupure par EcoRI* →	$^{5'}$G$^{3'}$ $^{3'}$CTTAA$^{5'}$	$^{5'}$AATTC$^{3'}$ $^{3'}$G$^{5'}$

les coupures sont dites à *bouts cohésifs*. En effet, dans ce cas il existe des parties « simple brin » qui peuvent s'apparier avec des extrémités cohésives obtenues par coupure d'un autre ADN par une même enzyme. Ces enzymes sont donc très utilisées pour mettre en œuvre les techniques du génie génétique.

Ces enzymes sont employées pour l'étude de l'ADN car elles coupent la molécule en fragments de petite taille, toujours les mêmes pour une molécule donnée, plus faciles à séquencer ; à titre d'exemple, EcoRI coupe l'ADN humain en 10^6 fragments environ.

Les fragments ainsi obtenus peuvent être séparés par électrophorèse, ce qui permet d'établir des cartes de restriction.

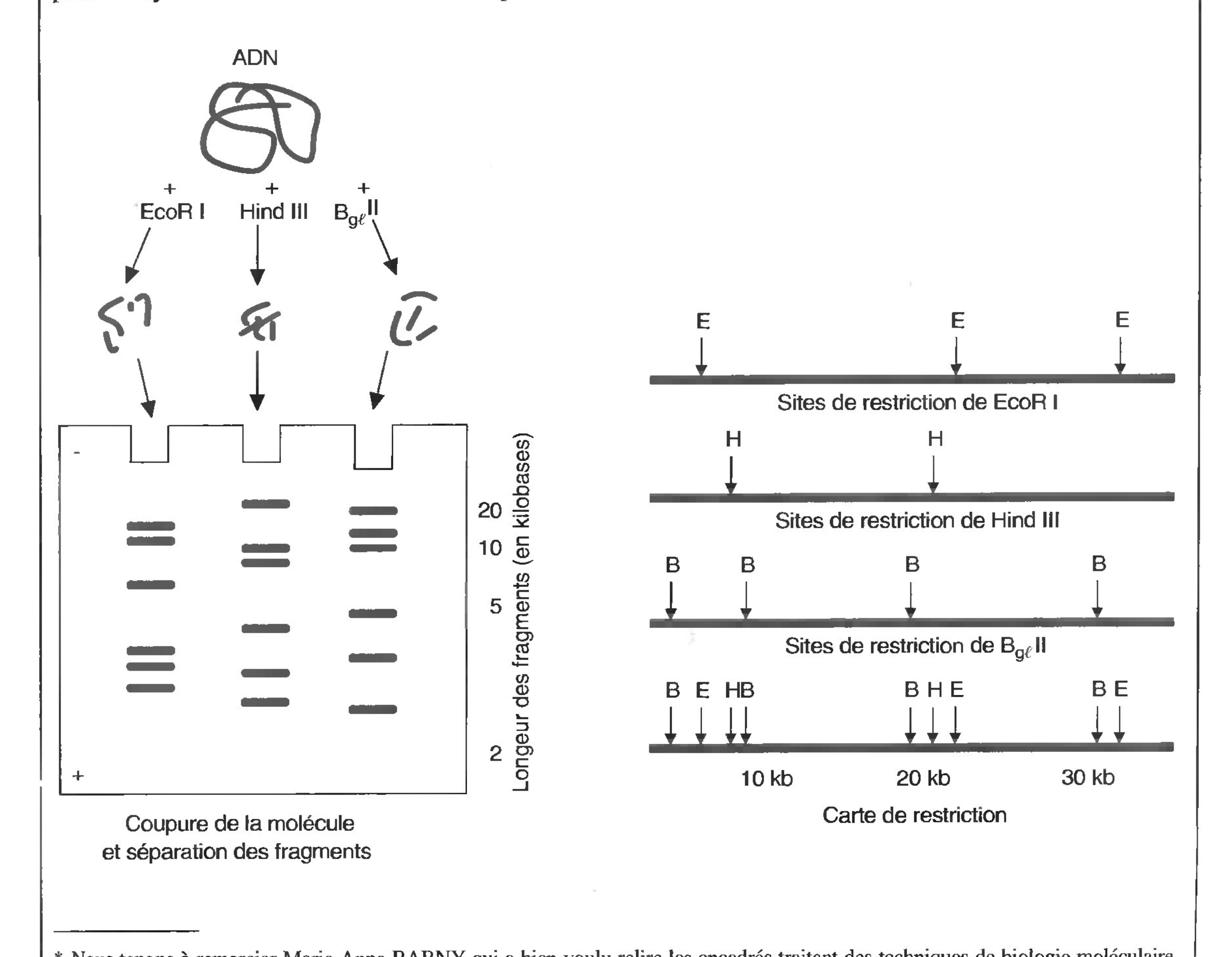
Les cartes de restriction

Plusieurs enzymes de restriction (EcoRI, HindIII et BgℓII) sont utilisées pour couper l'ADN isolé, un ADN viral ou un ADN génomique eucaryote par exemple; la même molécule est coupée en des sites différents par chacune de ces enzymes, produisant ainsi des fragments de longueurs variables. Ces fragments peuvent être séparés par électrophorèse; ils sont déposés dans des puits au sommet d'un gel de polyacrylamide, ou d'agarose, qui est placé dans un champ électrique. Par ses groupements phosphate l'ADN est chargé négativement; en conséquence, les fragments se déplacent dans le gel et migrent vers l'anode à une vitesse inversement proportionnelle à leur taille. Des témoins constitués par des polynucléotides dont la dimension est connue permettent d'estimer, en nombre de kilobases, la longueur des fragments de restriction obtenus.

Après migration, les gels sont colorés pour être examinés sous UV.

On peut ainsi établir des cartes de restriction, c'est-à-dire des représentations linéaires de la molécule analysée, sur lesquelles sont localisés les sites de restriction correspondant aux enzymes utilisées; ces cartes caractérisent un gène.

La comparaison de cartes de restriction du même gène, obtenues à partir de différents individus, permet de situer des modifications du génome (mutation par exemple) entraînant des altérations fonctionnelles; cette comparaison permet aussi, lorsqu'elle est réalisée entre espèces différentes, mais proches sur le plan systématique (primates par exemple), de déterminer leur degré d'affinité, les espèces les plus proches ayant les cartes de restriction les plus voisines.



* Nous tenons à remercier Marie-Anne BARNY qui a bien voulu relire les encadrés traitant des techniques de biologie moléculaire.

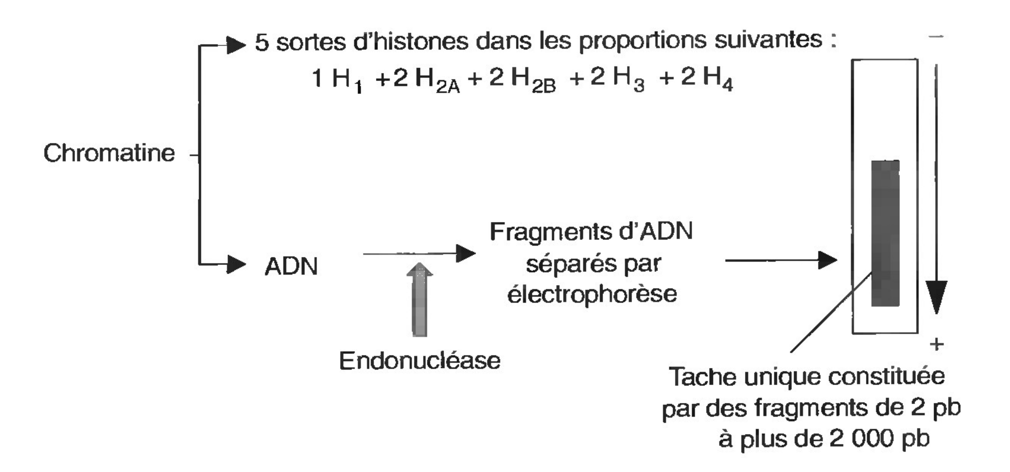


Fig. II-19 : Expérience démontrant que la protection de l'ADN contre l'endonucléase est une conséquence de son association avec les histones.

Cette seconde expérience montre que la nucléase peut couper la molécule d'ADN en des points très proches les uns des autres ; si ce type de coupure ne se produit pas au cours de la première expérience c'est que l'enzyme intervient sur un filament de chromatine, c'est-à-dire lorsque l'ADN est associé aux histones ; c'est cette association qui le rend accessible à intervalles plus ou moins réguliers ; **les histones protègent l'ADN**.

Troisième expérience : On traite cette chromatine isolée de manière prolongée par un mélange d'endonucléases ayant des sites de coupure différents. On obtient ainsi un seul type de fragments que l'on peut séparer par centrifugation, puis recueillir. On détermine la nature des protéines et, par électrophorèse, la longueur du polynucléotide associé à chaque fragment *(fig. II-20)*.

Il y a donc deux types d'agencements possibles au sein de la chromatine ; dans le premier, une longueur d'ADN correspondant à environ 200 paires de nucléotides est associée aux 5 histones dans des proportions telles que pour une histone H_1, il y a deux H_{2A}, deux H_{2B}, deux H_3, deux H_4 ; dans le second, une longueur d'ADN de 146 paires de nucléotides environ est associée à 8 histones, deux H_{2A}, deux H_{2B}, deux H_3, deux H_4, mais sans H_1.

La question que l'on peut se poser intéresse la position relative des histones et de l'ADN : les premières constituent-elles une sorte de coque autour du second, ce qui expliquerait l'inaccessibilité des endonucléases ?

Quatrième expérience : Si on traite de la chromatine isolée par la désoxyribonucléase I du pancréas, qui coupe un seul brin de la double hélice, les 5 histones sont libérées dans le milieu et l'ADN est dégradé en multiples fragments d'une dizaine de nucléotides. On en déduit que l'enzyme peut dégrader la molécule d'ADN sauf aux endroits où l'un des polynucléotides est accolé aux protéines ;

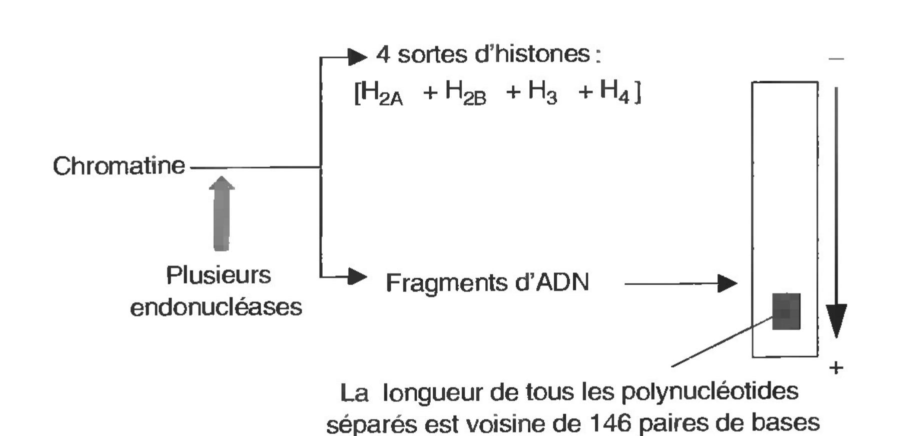


Fig. II-20 : Traitement prolongé de la chromatine par un mélange d'endonucléases et composition des fragments obtenus.

l'acide nucléique n'est donc pas protégé par ces dernières; elles ne font que gêner localement l'action de l'enzyme sur l'un des brins de la double hélice.

Isolement des protéines. Lorsque l'on procède à une séparation très douce des protéines histones on obtient des protéines H_3 et H_4 isolées mais également des dimères H_3-H_4 ou des tétramères H_3-H_4-H_3-H_4. Les tétramères correspondent donc vraisemblablement à un mode basal d'association pour ces deux sortes d'histones. Étant donné les proportions relatives qui existent entre les histones, on est conduit à admettre l'existence d'**un octamère protéique (2 H_{2A} + 2 H_{2B} + 2 H_3 + 2 H_4) autour duquel se trouve l'ADN**.

Étalement et ombrage rotatif de chromatine isolée. Cette technique, déjà utilisée pour observer le nucléoïde bactérien, montre que la chromatine est constituée par une succession de structures globulaires reliées les unes aux autres par un fin filament de 2 nm de diamètre environ *(fig. II-21)*. Cette image, qualifiée d'**organisation en collier de perles**, a confirmé les données précédentes et permis d'établir l'organisation du filament de chromatine.

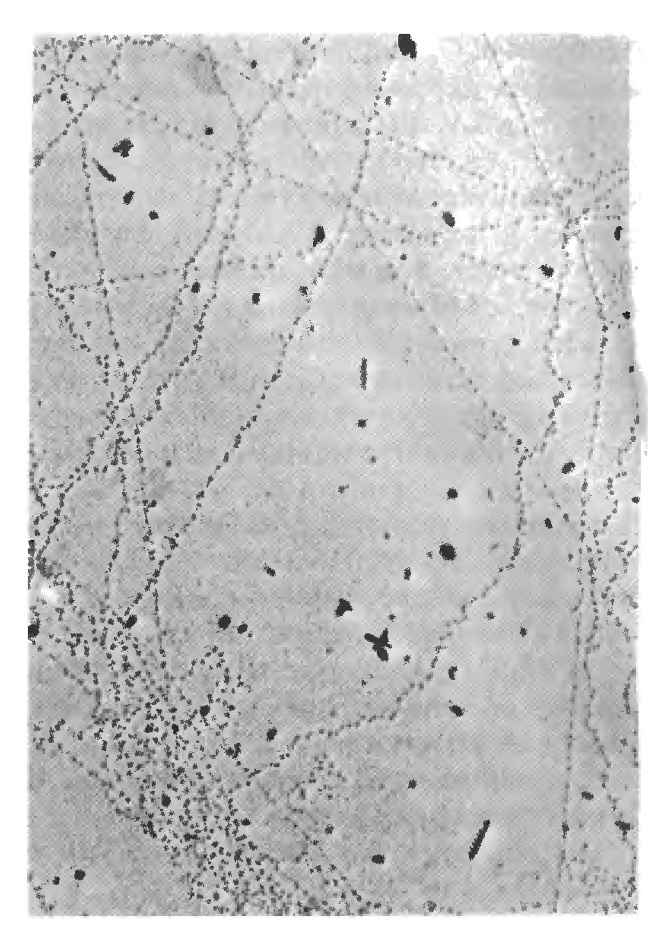


Fig. II-21 : Chromatine de plante supérieure étalée et observée en microscopie électronique après ombrage rotatif.
L'aspect en collier de perles est bien visible sur ce cliché. G. x 50 000.
(Reproduit de C. LUTZ et W. NAGL. A reliable method for preparation and electron microscopic visualization of nucleosomes in higher plants. Planta 1980; 149: 408-410.)

b. L'organisation nucléosomique

Ce modèle proposé par KORNBERG en 1974 est maintenant unanimement admis.

La macromolécule d'ADN, constituant le chromosome, s'enroule un tour 3/4 autour de l'octamère protéique *(fig. II-22)*, ce qui correspond à une longueur d'environ 160 pb mais elle n'est effectivement liée aux histones que sur une longueur de 146 pb. L'ensemble constitue ***le noyau nucléosomique*** ; à son niveau, l'acide nucléique, étroitement accolé aux protéines, est difficilement accessible aux enzymes.

Dans le nucléosome, les 8 protéines *dont les formes sont complémentaires* sont associées par des liaisons hydrophobes : *c'est le cœur protéique* dont l'élément central semble être le tétramère $(H_3\text{-}H_4)_2$. Des charges positives des arginines et des lysines sont exposées en surface ce qui permet leur interaction avec les charges négatives des groupes phosphates de

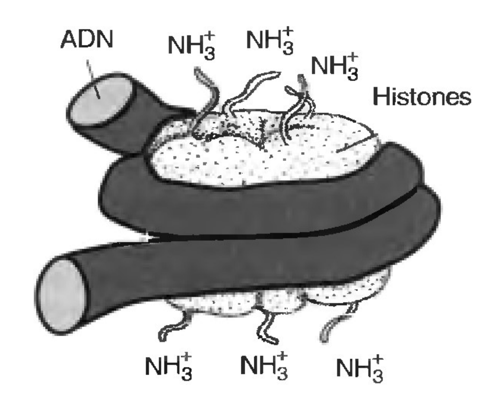


Fig. II-22 : Structure du cœur nucléosomique.
(D'après M. GRUNSTEIN, 1992.)

l'acide nucléique. Les extrémités N-terminales ne semblent pas intervenir directement dans l'organisation du cœur nucléosomique *(fig. II-22)*; en effet, si celles-ci sont éliminées enzymatiquement, l'organisation persiste. Exposées à l'extérieur, elles semblent plutôt interagir avec d'autres nucléosomes pour constituer des fibres de 30 nm (voir plus loin).

Schématiquement, on représente habituellement le nucléosome comme un cylindre relativement plat de 11 nm de diamètre et de 5 à 6 nm d'épaisseur entouré par l'ADN *(fig. II-23)*.

Entre deux noyaux nucléosomiques, la molécule d'ADN, ***très accessible aux nucléases***, constitue ***le lien internucléosomique***. La longueur de celui-ci est variable: elle se situe en moyenne autour de 60 pb; c'est dans ce lien internucléosomique que sont réalisées les coupures obtenues par les endonucléases agissant brièvement (fragments de 200 pb environ). Le noyau nucléosomique et le lien internucléosomique forment un ***nucléosome.***

La portion de molécule d'ADN associée aux protéines est dans un état contraint, comme le serait un ressort à boudin enroulé autour d'un tube; elle est plus arquée que la partie constituant le lien internucléosomique; la périodicité de l'hélice est à ce niveau perturbée; il n'y a plus 10,5 pb par tour comme dans la forme B habituelle, mais 10 pb. Cette contrainte est maintenue par la cinquième histone, H_1, dont une seule molécule est associée au nucléosome*. Le cœur hydrophobe de H_1 est vraisemblablement lié à l'octamère nucléosomique et les extrémités N et C terminales s'associent aux liens séparant les nucléosomes voisins. Ceci aurait deux conséquences: maintien des deux tours d'ADN autour de l'octamère et rapprochement des noyaux nucléosomiques. *On a alors un nucléofilament.*

Les observations en microscopie électronique de chromatine étalée révèlent, à côté du nucléofilament de 11 nm, ***des fibres de 30 nm***

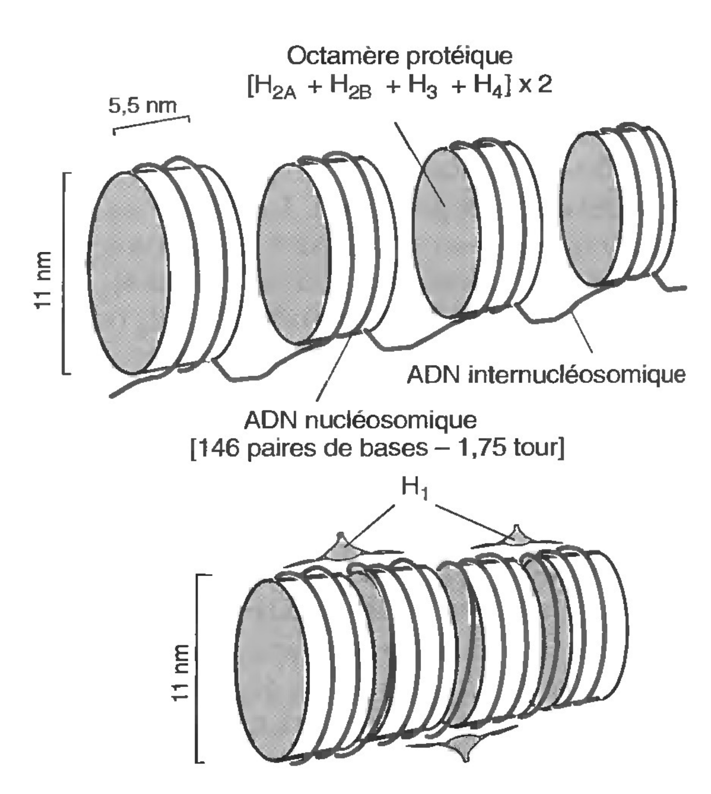


Fig. II-23: Nucléofilament déployé (en haut) et resserré (en bas).

qui sont constituées par le reploiement de la fibre nucléosomique. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le passage d'un type de filament à l'autre. Le modèle qui semble actuellement le plus en accord avec les données expérimentales est *le modèle solénoïde (fig. II-24, A)*. Dans celui-ci, le nucléofilament de 11 nm s'enroule en une spirale serrée avec 6 ou 7 nucléosomes par tour. Dans l'acquisition de cette structure d'ordre supérieur, l'histone H_1 joue un rôle important; elle est indispensable mais on ignore encore de quelle manière elle participe; on pense qu'elle occuperait une position centrale dans le solénoïde. Les extrémités N-terminales et les queues des histones H_3 et H_4 interviendraient également; en effet, *l'acétylation de ces protéines* (fixation d'un groupement acétyl sur les acides aminés basiques) désorganise la fibre de 30 nm; le filament chromatinien est alors sous une forme très étendue et le lien internucléosomique est aisément accessible aux enzymes. Ces phénomènes d'acétylation et de désacétylation jouent donc très certainement un rôle important dans les mécanismes de transcription et de réplication.

* H_1 n'est pas indispensable à la formation du nucléosome; chez les levures de bière, où les nucléosomes sont nombreux, il n'y a pas d'histone H_1; il semble plutôt qu'elle stabilise leur structure; elle intervient également dans la formation de la fibre de 30 nm.

On reproche toutefois à ce modèle de ne pas prendre en compte les mécanismes de régulation ; en effet, comme nous le verrons, certaines séquences d'ADN sont reconnues par des facteurs protéiques, les facteurs de transcription, qui s'y associent, contribuant à la fixation des polymérases ; on a donc proposé un modèle, dit modèle génétique, dans lequel des segments de fibre solénoïde plus ou moins longs sont séparés par des séquences accessibles aux protéines régulatrices *(fig. II-24, B)*.

Plus récemment, des observations de chromatine ont été réalisées sans fixation, sans ombrage, en utilisant un microscope réfrigéré à très basse température ; on a pu constater que, dans ces conditions, la chromatine ne présentait pas une organisation aussi régulière que celle proposée par le modèle solénoïde ; elle serait disposée en une suite de zigzags irréguliers dont l'importance dépend de plusieurs facteurs : la longueur L du lien entre deux nucléosomes successifs, la rotation R plus ou moins importante d'un nucléosome par rapport à l'autre, l'angle α existant entre le lien internucléosomique entrant et le lien sortant *(fig. II-24, C)*. Dans ce modèle, le rôle de l'histone H_1 est mal compris.

Dans le noyau interphasique, une très faible partie de la chromatine se trouve sous forme déployée (fibre nucléosomique ou fibre de 30 nm) ; c'est celle qui est en cours de transcription ou apte à être transcrite (voir 2e partie, chap. III). Le reste, c'est-à-dire la plus grande part de la chromatine, est sous une forme plus condensée dont l'organisation n'est pas encore très bien connue, bien que l'on ait mis en évidence des protéines favorisant cette condensation (par exemple HP_1 chez la Drosophile).

Ce degré élevé de condensation intéresse des portions souvent importantes de chromatine qui sont dès lors facilement mises en évidence en microscopie photonique par des

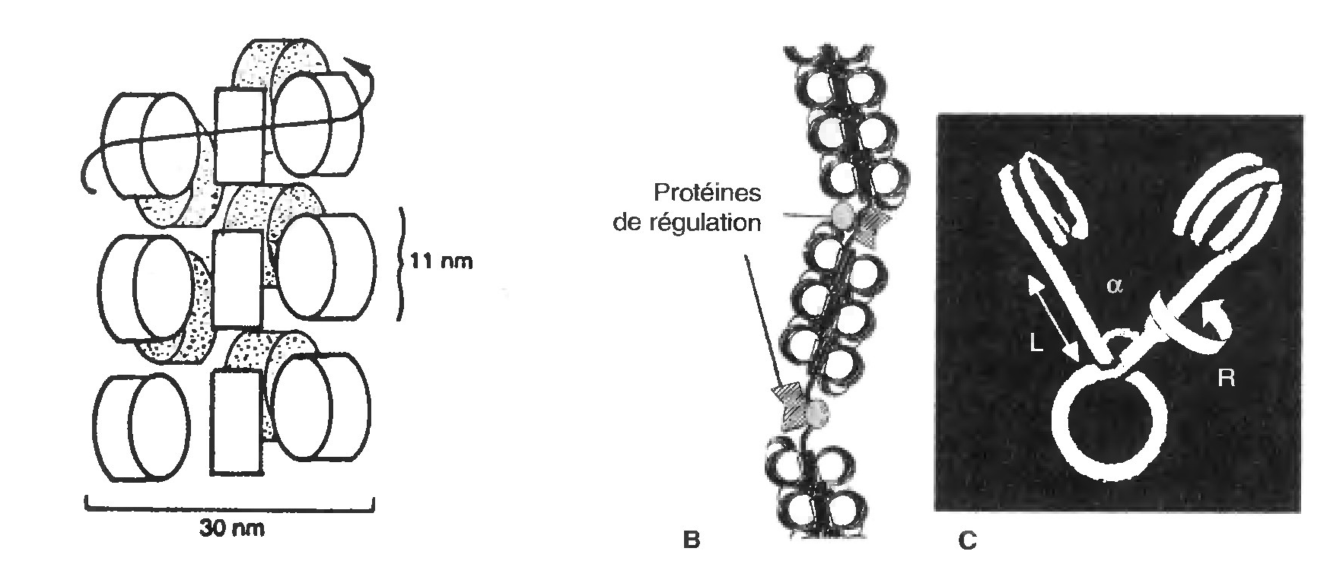


Fig. II-24 : Architecture de la fibre chromatinienne.

A) Modèle solénoïde conduisant à la formation d'une fibre régulière de 30 nm de diamètre.

B) Dans cette représentation, qualifiée de modèle génétique, la chromatine est toujours organisée en fibre de 30 nm sur des segments plus ou moins longs mais ceux-ci sont séparés les uns des autres par des séquences spécifiques de liaison où les protéines de régulation peuvent s'insérer.

C) Les observations réalisées en cryomicroscopie, sans altérations chimiques dues à des fixations et des inclusions, révèlent une disposition beaucoup moins régulière des nucléosomes que celle proposée dans les modèles précédents. La fibre présente en effet un tracé irrégulier, en zigzag, qui dépend de plusieurs facteurs indiqués sur ce schéma : la longueur L du lien entre deux nucléosomes successifs, la rotation R plus ou moins importante d'un nucléosome par rapport à l'autre, l'angle α existant entre le lien internucléosomique entrant et le lien sortant. La fibre présente alors un enroulement hélicoïdal très irrégulier ; il y a possibilité d'interpénétration de régions appartenant à des fibres voisines.

(C : d'après A. HOROWITZ et C.L. WOODCOCK. Chromatin organization reviewed. Trends in Cell Biology 1995 ; 5 : 272-277.)

colorations ou des réactions cytochimiques (réaction de Feulgen). On distingue ainsi :

– *l'hétérochromatine* (du grec *heteros*, différent), très colorable, qui correspond à des portions plus ou moins importantes d'un chromosome, notamment celles situées aux extrémités, les télomères, et celle occupant une région plus centrale, le centromère. Cette condensation est une forme d'inactivation du matériel génétique qui, dans cet état, est inaccessible aux ARN polymérases ;

– *l'euchromatine* (du grec *eu*, vrai) qui correspond à la chromatine dispersée est très accessible aux enzymes de transcription.

L'importance relative de ces deux formes d'organisation chromatinienne peut varier dans les cellules. Il faut d'ailleurs noter que l'hétérochromatine et l'euchromatine se succèdent le long d'un même chromosome.

2.4. L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE ET LES STRUCTURES ASSOCIÉES

Le rôle fondamental de l'enveloppe nucléaire est **d'isoler le génome et ses activités dans un environnement biochimique unique et particulier, le noyau**. En outre, comme nous le verrons plus loin, ces membranes participent, par l'intermédiaire des structures qui leur sont associées, à la disposition spatiale des chromosomes, supports de l'information génétique. Enfin cette enveloppe, percée de pores, régule les échanges entre les deux milieux fondamentaux de la cellule eucaryote, le cytoplasme et le nucléoplasme.

L'enveloppe nucléaire proprement dite est composée par deux membranes, séparées par un espace intermembranaire d'importance variable, dont la composition et l'organisation ne diffèrent pas sensiblement de celles des autres membranes plasmiques : elles contiennent 30 % de lipides polaires et 70 % de protéines (données pondérales) associées en une mosaïque fluide.

Ces deux membranes sont en continuité au niveau des pores. Bien qu'elles soient difficiles à séparer, ce qui limite les possibilités d'analyses biochimiques, on a pu noter qu'elles se distinguaient l'une de l'autre par leur composition ; on note par exemple la présence de cytochrome P450 dans la membrane externe, ce qui confirme ses rapports très étroits avec le réticulum endoplasmique dans lequel ce transporteur d'électrons est bien représenté. Mais c'est surtout au niveau des protéines intégrées que les distinctions sont les plus nettes. L'association de l'enveloppe nucléaire avec les ribosomes, les complexes des pores, la lamina impose *l'existence de domaines membranaires se distinguant les uns des autres par les protéines intégrées* assurant la fixation des structures qui viennent d'être énumérées ; on a ainsi pu localiser une glycoprotéine responsable de l'accrochage du complexe des pores ; une autre protéine de 58 kilodaltons permettrait l'ancrage de la lamina à la membrane interne. Cette dernière protéine a été beaucoup étudiée ; elle serait formée de 8 segments hydrophobes fonctionnant comme domaines transmembranaires et son extrémité N-terminale serait orientée vers le nucléoplasme.

La lamina est un réseau fibrillaire généralement très mince (*fig. II-25*), appliqué contre la face interne de l'enveloppe nucléaire intercon-

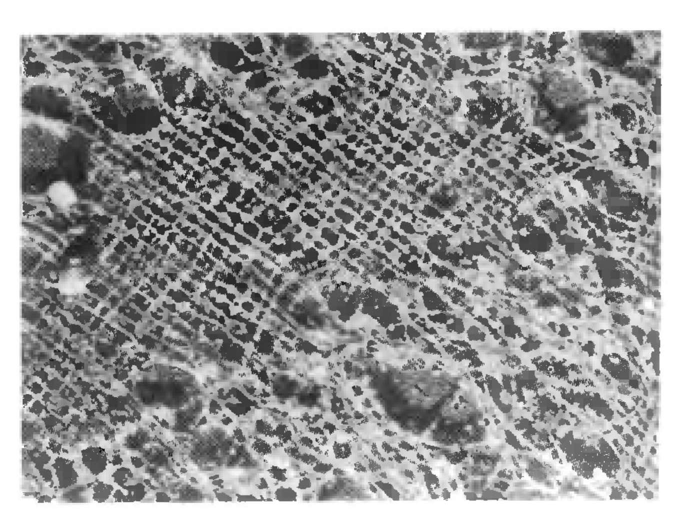
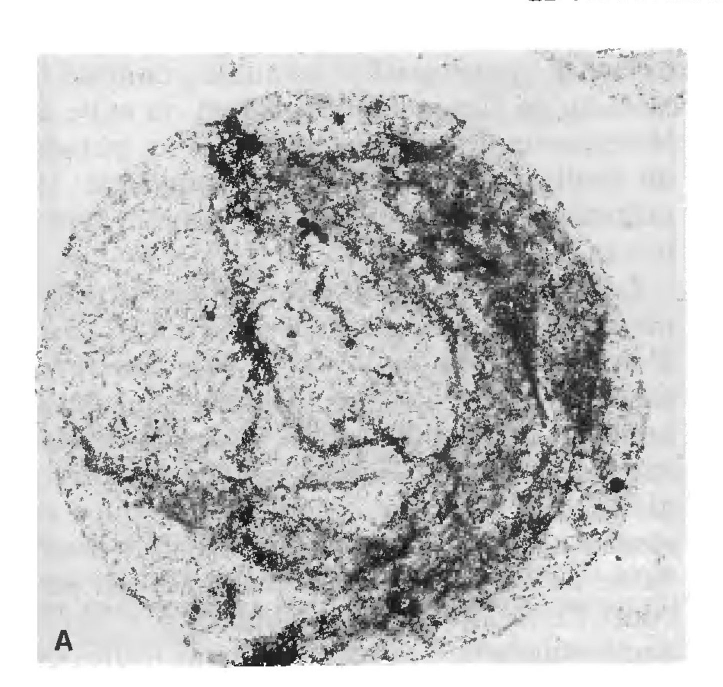


Fig. II-25 : Lamina isolée, vue de face en microscopie électronique, après ombrage rotatif.
Les lamines dessinent un réseau qui, par endroit, évoque un véritable tissage car la disposition des molécules fibreuses y est très régulière. G. X 12 000.
(Reproduit de L. GARACE. Nuclear lamina and organization of nuclear architecture. Trends in biochemical Sciences 1986 ; 11 : 443-446.)



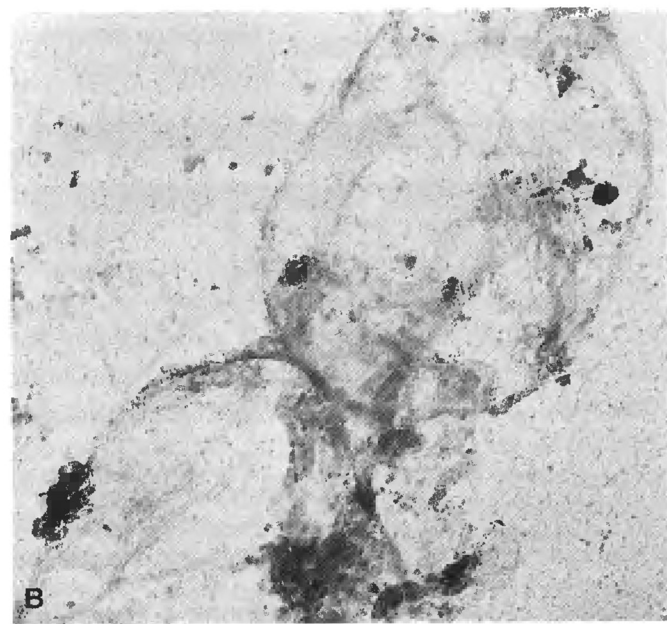


Fig. II-26: Lamina isolée à partir de cellules tumorales (A) et de cellules méristématiques de Haricot (B), observée en totalité.
G. x 20000. *(Reproduit de Z.I. GALCHEVA-GARGOVA* et al. *Isolation of nuclear shells from plants cells. Plant, Cell and Environment 1988; 11: 819-825.)*

nectant les complexes associés aux pores. C'est une structure fine mais cohérente que l'on a pu isoler. Après élimination des membranes nucléaires interne et externe et solubilisation des protéines et de l'ADN de la chromatine, elle demeure en effet sous forme d'une fine enveloppe qui conserve la taille et l'aspect du noyau *(fig. II-26)*. Cette lamina joue donc un rôle structural important dans la détermination de la forme et le maintien de la cohésion nucléaire. Cette structure particulière est formée par l'association d'au moins deux types de polypeptides fibreux, *les lamines*, très comparables à ceux constituant les filaments intermédiaires du cytoplasme (voir p. 278); leur masse moléculaire moyenne est située entre 60 et 80 kilodaltons. Ce sont des molécules très stables, dont on connaît plusieurs formes. Chez les Vertébrés, la lamina est constituée par l'association de deux à quatre lamines qui peuvent être réparties entre deux types: les lamines de type A qui sont solubilisées au cours de la mitose et les lamines de type B qui demeurent associées aux vésicules résultant de la fragmentation de l'enveloppe nucléaire en prométaphase (voir p. 396); les lamines C, longtemps considérées comme formant un troisième type, sont en fait des protéines codées par les mêmes gènes que les lamines A (gènes *LMNA*), mais ayant un métabolisme post-transcriptionnel différent: le transcrit primaire est le même, mais il subit une excision et un épissage différents, au niveau de leur partie C-terminale seulement, car les 566 premiers amino-acides des deux protéines sont identiques.

Les différentes lamines ne contiennent pas de domaines hydrophobes suffisants pour permettre leur insertion dans la bicouche lipidique de la membrane interne. Elles sont associées à cette dernière par l'intermédiaire de protéines intégrées (protéines LBR/58 kDa, LAP, émerine) dont il existe de nombreuses isoformes; certaines de ces protéines réalisent probablement aussi l'ancrage de la chromatine *(fig.II-27)*, vraisemblablement en se liant au cœur hydrophobe constitué par les histones; pour les lamines B; c'est par un groupe de quatre acides aminés* de l'extrémité C terminale que s'effectue cette association; pour les lamines A et C, c'est également la région C-

* Cystéine-Alanine-Isoleucine-Méthionine.

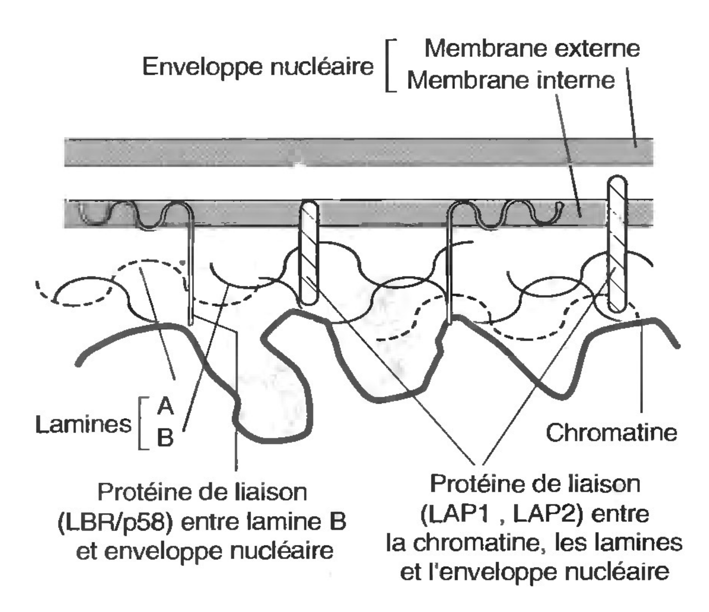


Fig. II-27 : Association de la lamina à l'enveloppe nucléaire.

Les lamines A et B ne possèdent pas de sites d'insertion dans la membrane nucléaire interne. Ce sont d'autres protéines, les **LAP** *(Lamina Associated Polypeptide)*, dont on connaît plusieurs types selon leur mode d'insertion dans la bicouche lipidique, et la **LBR/p58**, *(Lamin B Receptor)*, possédant plusieurs séquences transmembranaires, qui assurent la liaison enveloppe-lamina. L'accrochage de la chromatine (en rouge) à la lamina serait réalisé par l'intermédiaire des LAP et des LBR/p58 et peut-être par les lamines elles-mêmes qui peuvent s'associer au cœur protéique hydrophobe de certains nucléosomes.

terminale qui contient un site de liaison à l'ADN.

De nombreuses interactions ont par ailleurs été mises en évidence, non seulement entre la chromatine et la lamina, mais aussi entre lamina et complexes des pores, entre lamina et facteurs de transcription, et entre lamina et ARN polymérase II. Il s'ensuit qu'on attribue désormais un rôle non négligeable à la lamina dans la duplication des gènes et dans celle de leur expression, mais les modalités de ces régulations ne sont pas encore comprises. Ce rôle, autre que structural, est toutefois confirmé par le fait que des mutations intervenant au niveau de gènes *LMNA* (codant, rappelons-le, pour les lamines A et C) sont à l'origine d'au moins six maladies graves exprimées dans des tissus très différents ; *ces laminopathies* touchent en effet les muscles striés (dystrophie musculaire d'Emery-Dreiffuss), le tissu adipeux (lipodystrophie), le tissu nerveux (neuropathie axonale, comme la maladie de Charcot-Marie Tooth ou celle de Hutchinson-Gilford, la *progeria* ou maladie du vieillissement prématuré), le squelette ; les mécanismes pathologiques demeurent toutefois inconnus.

Le nucléosquelette interne est une structure nucléaire dont l'importance réelle est en cours d'étude. Lorsque des noyaux isolés sont traités successivement par des nucléases (qui éliminent l'ADN et les ARN) et des solutions salines fortes (qui solubilisent les protéines globulaires), il reste associé à la lamina un réseau tridimensionnel intranucléaire, observable en microscopie électronique, qui parcourt l'ensemble du nucléoplasme. C'est le nucléosquelette ou matrice intranucléaire. On a pu montrer que de courtes séquences d'ADN demeurent associées à ce réseau lorsque les traitements par les nucléases et les solutions salines ne sont pas trop drastiques. Il semble donc que **ce réseau nucléosquelettique sert de support pour l'organisation de la chromatine**.

Il y a toutefois controverse pour ce qui concerne l'importance réelle de ce réseau, car les méthodes utilisées pour le mettre en évidence, essentiellement les dissolutions salines, peuvent extraire certaines protéines (le réseau alors apparaîtrait plus réduit qu'il n'est en réalité) ou, au contraire, en insolubiliser d'autres qui n'interviennent pas dans l'organisation de ce nucléosquelette (qui donc semblerait plus important). On estime actuellement que deux types de constituants participent à la formation de la matrice nucléaire interne : des fibres épaisses, polymorphes, variables d'un type cellulaire à l'autre, qui sont éliminées lorsque les concentrations salines sont élevées ; de très fins filaments, très résistants aux extractions qui forment la matrice fondamentale.

Le nucléosquelette interne apparaît donc constitué par deux réseaux superposés : un fibrillaire et un granulaire *(fig. II-28)*. Le premier, formé par des protéines fibreuses, jouerait le rôle de support pour le second qui est édifié, lui, par des protéines globulaires parmi lesquelles se trouvent les complexes multienzymatiques intervenant dans les mécanismes de la transcription et de la duplication.

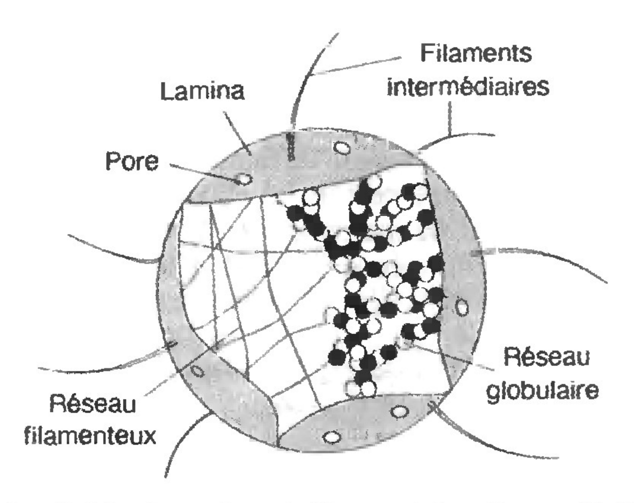


Fig. II-28 : Représentation schématique de la matrice nucléaire (lamina + nucléosquelette) et de ses relations avec les filaments intermédiaires du cytosquelette.
La composante fibrillaire est seule représentée dans la partie gauche du schéma, alors que les constituants fibrillaires et granulaires sont figurés dans la partie droite.
(D'après H.E. DACHENG et al. *1990.)*

L'association entre la lamina et la matrice nucléaire interne serait réalisée par l'intermédiaire de protéines appartenant à la famille des LAP (***Lamina Associated Polypeptides***), des protéines fibrillaires appelées TPR et des constituants des pores, les nucléoporines.

Ce nucléosquelette (lamina, complexe des pores, matrice interne) serait lié aux filaments intermédiaires du cytoplasme*.

La présence de ***pores nucléaires*** a été suggérée par HERTWIG dès 1876, mais c'est l'avènement de la microscopie électronique qui a établi définitivement leur existence. Ils sont généralement nombreux comme le montrent les clichés réalisés en microscopie électronique sur des répliques obtenues à partir de cryofractures ou sur les fragments d'enveloppe isolée *(fig. II-29)*. En règle générale, *plus la cellule est active et plus les pores sont nombreux*, ce qui est bien en rapport avec le rôle joué par ces structures dans les échanges nucléo-cytoplasmiques ; ainsi, sur les observations de surfaces nucléaires on en compte 50 à 60/μm^2 dans les ovocytes du Xénope, 15 à 20/μm^2 dans les cellules de foie de rat, 1/μm^2 dans les hématies d'oiseaux.

Les complexes des pores sont des structures qui bordent les ouvertures circulaires de l'enveloppe du noyau mettant en communication le cytoplasme et le nucléoplasme. Étant donné l'importance des échanges entre ces deux territoires, et compte tenu du fait que les pores nucléaires sont les seuls sites connus de ces transferts bidirectionnels de molécules parfois volumineuses, ces structures ont été l'objet de très nombreuses études au cours des dernières années. Celles-ci ont montré que ce sont des organisations complexes, formées par un ensemble macromoléculaire certainement encore incomplètement connu. On a longtemps pensé que plusieurs centaines de nucléoporines différentes (les protéines les constituant) participaient à leur édification. On estime maintenant que seulement une trentaine d'espèces protéiques, à rôle structural, en sont les constituants permanents ; mais de nombreuses autres molécules, dont de nombreuses nucléoporines, leur *sont associées temporairement* ; le rôle de ces dernières est essentiellement fonctionnel ; il s'ensuit que l'isolement des complexes des pores peut aboutir à celui d'un nombre considérable de molécules, entre 200 et 500, l'importance de ce nombre témoignant de la complexité fonctionnelle de ces structures.

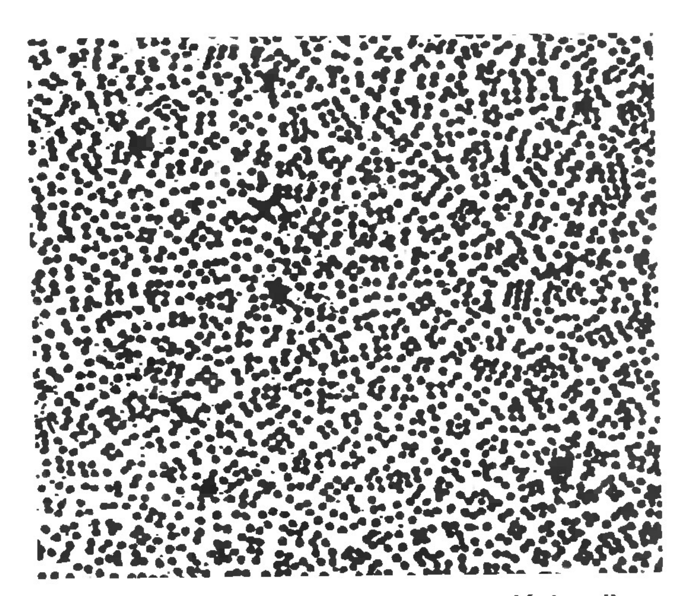


Fig. II-29 : Fragment d'enveloppe nucléaire d'ovocyte d'amphibien isolé et observé de face. Noter le nombre élevé de pores.
G. x 5000.

* Il contribue ainsi au positionnement du noyau dans la cellule en l'arrimant au cytosquelette.

La microscopie électronique et les études immunocytochimiques, faisant appel à des anticorps marqués dirigés contre les protéines isolées des complexes, a permis d'établir un schéma qui, même s'il est encore provisoire, donne une idée de l'extraordinaire échafaudage macromoléculaire ainsi constitué *(fig.II-30, A et B)*.

On considère *actuellement* qu'un complexe est formé par huit structures, les bras ou rayons, régulièrement espacées, disposées radialement à partir d'un anneau interne, lui même ceinturant un tube central, *le transporteur central*. Chaque rayon est lié à ses voisins par quatre anneaux coaxiaux : l'interne, déjà

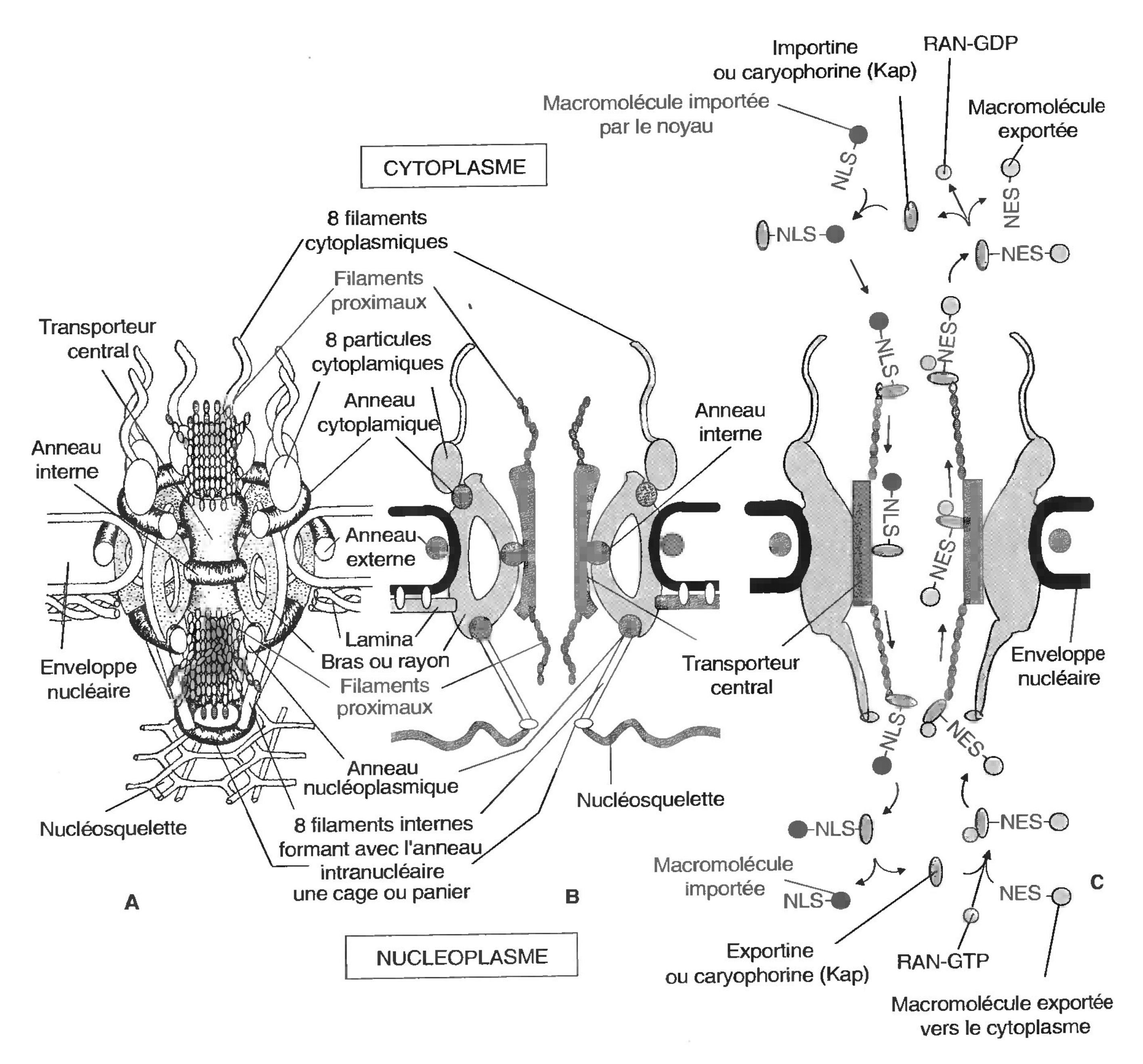


Fig. II-30 : Le complexe des pores nucléaires.
A) Représentation schématique tridimensionnelle.
B) Représentation schématique en coupe longitudinale.
C) Échanges macromoléculaire entre le cytoplasme et le noyau (partie gauche du schéma) et entre le noyau et le cytoplasme (partie droite du schéma).
(D'après M.P. Rout et S.R. Went, Trends in Cell Biology, 1994, 4,357-365 ; M.P. Rout et J.D. Aitchison, Journal of Biological Chemistry, 2001,16593-97 et M.P.ROUT et al., Trends in Cell Biology, 2003, 13, 622-628.)

indiqué ; un cytoplasmique et un autre nucléoplasmique ; enfin, un anneau externe, *car situé hors du complexe, à l'intérieur de l'enveloppe nucléaire*. Ainsi insérés dans l'espace périnucléaire, les rayons traversent le pore ; le transporteur central est, quant à lui, percé par un canal axial d'environ 30 nm de diamètre. Sur la face cytosolique, huit filaments sont liés à l'anneau cytoplasmique ; vers l'intérieur de l'organite, on note également la présence de huit filaments, attachés à l'anneau nucléoplasmique ; ces derniers convergent vers un plus petit anneau, intranucléaire, lui-même lié au nucléosquelette interne, l'ensemble constituant une sorte de cage ou panier. Le complexe du pore, *dont la symétrie est octogonale*, occupe une surface de 120 nm de diamètre sur la membrane nucléaire externe ; son épaisseur se situe autour de 80 nm. L'ensemble est connecté à la lamina. L'essentiel des molécules qui sont associées temporairement au complexe des pores forment des sortes d'expansions plus ou moins nombreuses associées aux faces cytoplasmique et nucléoplasmique du transporteur central, ce sont les *filaments proximaux. Les nucléoporines de ces filaments contiennent de multiples copies d'un même motif, constitué de Phénylalanine-Glycine*, séparées par des séquences polaires de longueur variées.

Étant donné sa position, à la jonction des membranes externe et interne, ce complexe doit contribuer à la ségrégation des protéines des deux faces de l'enveloppe nucléaire, interdisant le passage de ces volumineuses molécules de l'une à l'autre.

Les transferts entre le cytoplasme et le nucléoplasme sont particulièrement intenses et variés : histones, protéines ribosomales, sous unités préribosomales, enzymes de transcription et de réplication, facteurs de transcriptions, ions... On a calculé par exemple, que, chez les Mammifères, pendant la période de synthèse de l'ADN (phase S), 100 molécules transitent par minute au niveau d'un pore nucléaire. Il semble maintenant bien établi que tous les transferts sont réalisés au niveau du transporteur central ; celui-ci peut s'élargir, passant d'un état de repos, laissant traverser seulement les plus petites molécules, à un état *dilaté libérant le passage à des macromolécules* importantes (préribososmes, facteurs ou enzymes de transcription par exemple).

L'injection de protéines marquées dans le cytoplasme d'une cellule, ovocyte d'amphibien par exemple, permet de comprendre le rôle régulateur important joué par ces complexes des pores. Si les protéines sont de petite taille, elles pénètrent aisément et, en moins de 24 h, elles sont réparties de manière équitable entre noyau et cytoplasme, quelle que soit l'origine de ces protéines. Par contre, lorsque leur masse moléculaire est importante, au-dessus de 40 kilodaltons, la situation est différente. Si par exemple une protéine nucléaire, la nucléoplasmine*, et de l'albumine de sérum de bœuf (BSA) sont injectées simultanément, seule la nucléoplasmine s'accumule dans le compartiment nucléaire ; ***le transport est donc sélectif***.

Les ions et les petites molécules (nucléotides par exemple) diffusent simplement au niveau du pore ; il n'en est pas de même pour les molécules plus volumineuses. La nucléoplasmine a permis de mieux comprendre le mécanisme impliqué. Injectée dans l'ovocyte, cette protéine pénètre très rapidement dans le noyau sauf si les 10 à 15 acides aminés situés à l'extrémité N-terminale sont éliminés. Il y a donc *une séquence signal*, appelée NLS (pour *Nuclear Localization Signal*). De même, on a mis en évidence l'existence d'un signal sur les molécules destinées à quitter le noyau pour aller vers le cytoplasme, c'est la NES (pour *Nuclear Export Signal*).

L'étude systématique de protéines transportées rapidement vers le compartiment nucléaire a permis d'établir les caractéristiques de cette séquence signal. 1) Elle est courte (8 à 10 acides aminés). 2) Elle comporte de nombreux acides aminés chargés (arginine et lysine). 3) Elle peut se situer en un point quelconque de la protéine à partir du moment où elle est exposée en surface. 4) Elle n'est pas éliminée après pénétration dans le noyau.

---

* C'est une protéine chaperon intervenant dans l'association des histones au moment de la formation du nucléosome.

Les protéines transportées (protéines nucléaires, ARNm, ARNt, préribosomes...) qualifiées de « cargo », possédant les signaux de reconnaissance, NLS ou NES, selon leur origine et leur destination, sont reconnues par une famille de protéines réceptrices de transport appelées collectivement ***caryophorines*** ou ***Kaps*** (de l'anglo-saxon ***Karyophorines***) mais connues également sous les noms d'importines et d'exportines, ce qui est plus évocateur de leur rôle. Ces protéines sont solubles; il y a interaction entre cargo et transporteur, puis formation d'un complexe cargo-NLS-Kap dans le cytoplasme ou cargo-NES-kap dans le nucléoplasme *(fig. II-30, C)*.

Ce sont ces complexes qui sont identifiés au niveau des nucléoporines riches en séquences hydrophobes phénylalanine-glycine, constituant l'essentiel des filaments proximaux. Ils interagissent avec elles certainement par l'intermédiaire des séquences hydrophobes des caryophorines. Ces nouveaux complexes transitent à travers le pore toujours associés, et vraisemblablement guidés par les nucléoporines à phénylalanine-glycine. Dans le compartiment de destination, le complexe cargo-kap se dissocie libérant la molécule transportée *(fig. II-30, C)*.

Le transport nucléocytoplasmique peut être réalisé contre un gradient de concentration, ce qui suppose un apport d'énergie. On a cependant constaté que le transfert lui-même n'est pas consommateur d'énergie, mais qu'il ne peut se faire qu'en présence d'un gradient énergétique établi entre le nucléoplasme et le cytoplasme, le premier étant riche en une *protéine Ran-GTP*, alors que dans le second on ne trouve qu'une *protéine Ran-GDP*. Le mécanisme de transport actuellement admis serait celui-ci : les importines libèrent leur cargo, lorsqu'elles interagissent avec Ran-GTP dans le nucléoplasme alors que les importines se lient à leur cargo seulement après hydrolyse du GTP sur Ran, c'est-à-dire en présence de Ran-GDP, dans le cytoplasme *(fig. II-30, C)*.

On a constaté que les Ran-GTPases sont essentiellement localisées à proximité des pores car elles comportent des motifs permettant leur association aux nucléoporines; cette association évite la dispersion de ces molécules dans le cytoplasme et, en maintenant une concentration enzymatique élevée au niveau des pores, permet l'optimisation des transferts.

2.5. DISPOSITION INTRANUCLÉAIRE DU NUCLÉOFILAMENT

La quantité d'ADN contenue dans le noyau est considérable. Rappelons que dans le noyau d'une cellule somatique humaine il y a 46 chromosomes qui, s'ils étaient totalement déployés et placés bout à bout représenteraient une longueur d'environ deux mètres, c'est-à-dire, en admettant très arbitrairement pour tous les chromosomes une longueur équivalente, que chacun d'entre eux atteindrait environ 5 cm. Cet ensemble doit être logé dans une sphère, le noyau, dont le diamètre se situe entre 7 et 10 µm. On peut donc s'interroger sur la manière dont l'information est disposée, étant entendu qu'elle doit toujours être accessible aux enzymes et aux protéines régulatrices.

L'organisation de l'ADN autour des nucléosomes et l'agencement de ces derniers en fibre solénoïde réduisent la longueur d'un chromosome de 5 cm en moyenne à 1 mm; c'est bien entendu encore trop et il doit exister des reploiements d'ordre supérieur mais on en ignore encore la nature.

En ce qui concerne la disposition intranucléaire des différents chromosomes, il est probable qu'elle n'est pas aléatoire. ***On suppose que le chromosome est lié en trois points au moins à la lamina*** : par les séquences hautement répétées trouvées à ses extrémités, les télomères*, et par la région particulière, également riche en séquences répétées, que constitue le centromère. Chaque chromosome occupe donc un territoire propre, parfaitement déterminé au sein du noyau, identifié par rapport à l'enveloppe nucléaire *(fig. II-31)*. Il n'y

---

* Les télomères empêchent, en outre, la soudure des chromosomes et permettent donc le maintien de l'information génétique sur plusieurs éléments linéaires indépendants, situation dont l'importance se manifeste lors de la reproduction sexuée (voir *crossing-over*), 2e partie, chap. IX).

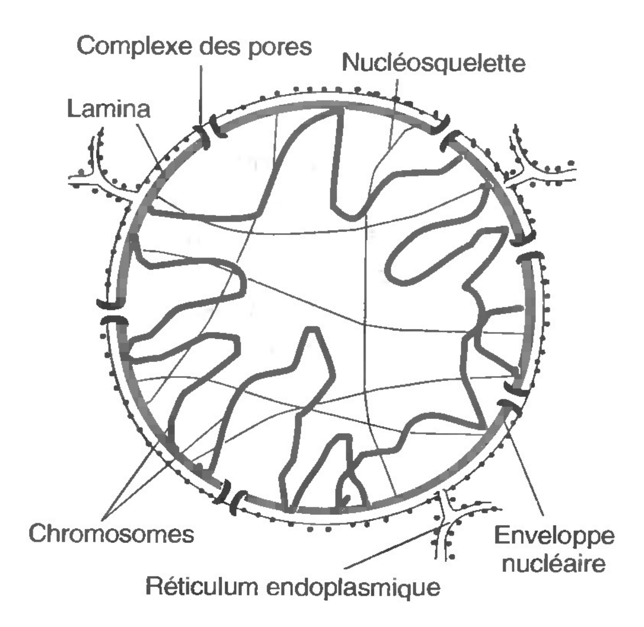


Fig. II-31 : Représentation schématique de l'organisation du noyau.
(D'après L. GARACE, 1986.)

aurait donc pas d'interaction entre les différents chromosomes, ce qui est particulièrement important en ce qui concerne la localisation de l'information génétique et surtout pour la mise en œuvre des mécanismes d'appariement au début de la méiose (voir p. 407). On pense également qu'ils seraient liés en d'autres points à des protéines qui, à l'intérieur du nucléoplasme, s'organisent en un réseau tridimensionnel, le nucléosquelette interne ; la liaison entre fibre chromatinienne et élément du réseau pourrait être réalisée par les protéines enzymatiques formant les volumineux complexes intervenant dans la transcription de l'information génétique en ARN (p. 206) et dans la duplication de l'ADN (p. 373) ; des topo-isomérases seraient également présentes en ces points particuliers.

Il n'est pas concevable, en effet, que les domaines où s'exercent la transcription de l'information génétique, la réplication de l'ADN et sa réparation éventuelle, soient disposés au hasard. De nombreuses études suggèrent que la régulation de la transcription dépend de l'organisation topologique et structurale du noyau ; ainsi, on a pu montrer que la répression de l'expression de certains gènes bien identifiés s'accompagne de leur relocalisation à proximité de territoires nucléaires, riches en hétérochromatine ; *ces domaines seraient silencieux* pour employer une expression imagée ; par contre, il n'est pas exclu que ces derniers puissent jouer un rôle essentiel dans la duplication et la réparation de l'ADN.

Il semble donc établi que le positionnement des domaines fonctionnels est régulé à l'intérieur du volume nucléaire et que cette position peut varier dans le temps ; le modèle actuel serait celui de gènes mobiles par rapport à des facteurs de transcription, de réplication ou de réparation groupés en sites immobiles, car associés au nucléosquelette interne ; **la constitution de ces sites d'assemblage de machineries de réplication, transcription et maturation, indispensables au bon fonctionnement des gènes, serait la voie utilisée par la cellule pour réguler l'expression génique.**

En fait, la régulation, essentielle pour que puisse s'établir et se maintenir des types cellulaires différenciés, implique un rôle important du nucléosquelette, mais les modalités d'intervention de celui-ci, qui s'exerce par la liaison de protéines d'association spécifiques entre le nucléosquelette et les facteurs de transcription, de réplication et de réparation en des sites définis, n'est pas encore vraiment comprise.

CONCLUSION

Il apparaît donc nettement que le noyau des cellules eucaryotes est un compartiment dont la mise en place au cours de l'évolution a joué un rôle fondamental ; son intervention se situe dans trois domaines essentiels :

– la structuration d'un matériel génétique particulièrement abondant ;

– le contrôle des échanges nucléoplasmiques ;

– la création d'un environnement favorable dans la zone où s'effectuent les transcriptions.

Les processus métaboliques qui y sont réalisés pourront donc être mieux contrôlés que chez les Procaryotes ; les chapitres qui suivent en apporteront une illustration.

CLONAGE ET BANQUES D'ADN

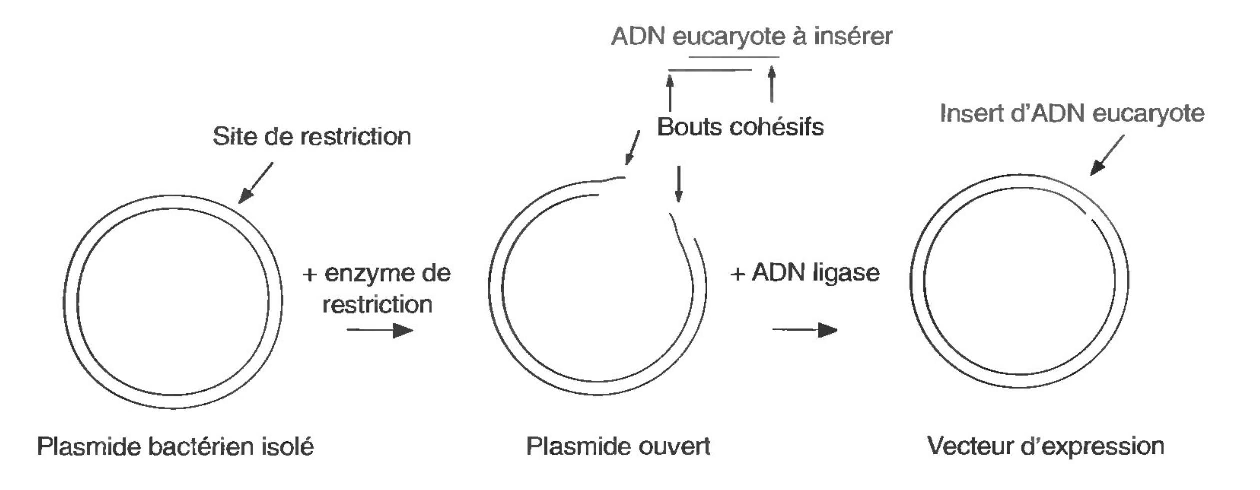
Le terme de *clonage* est utilisé couramment dans les méthodes du génie génétique mais avec un double sens : le premier est le sens littéral, c'est-à-dire la reproduction identique des molécules d'ADN isolées d'un organisme, le second s'applique à la méthode qui permet d'isoler et de multiplier une séquence particulière, un gène, de ce même organisme.

Le principe de la méthode est relativement simple : il consiste à introduire dans des bactéries les fragments d'ADN isolés inclus dans un plasmide vecteur ; la bactérie, en se multipliant, réplique l'ADN étranger en même temps que le sien. Lorsque la bactérie s'est suffisamment multipliée, on isole l'ADN du vecteur plasmidique.

1. Introduction dans le vecteur

Le vecteur est un plasmide bactérien qui peut être isolé et purifié relativement facilement.

L'ADN à multiplier est obtenu par fragmentation du génome à l'aide d'une enzyme de restriction (comme EcoRI, voir p. 176) ; le plasmide utilisé doit, pour que l'on puisse introduire l'ADN à cloner, posséder un site de restriction identique. Les endonucléases utilisées sont généralement celles produisant des « bouts cohésifs » ; le plasmide et les fragments d'ADN étranger possèdent donc des extrémités complémentaires qui peuvent, lorsqu'ils sont réunis, s'apparier (voir p. 176). Une fois l'appariement réalisé, les deux polynucléotides, le bactérien et l'eucaryote, sont associés par des liaisons covalentes à l'aide d'une ADN-ligase*.



* Des enzymes produisant des bouts francs sont également souvent utilisées ; les modalités d'association de l'ADN à cloner au vecteur sont alors sensiblement différentes.

Le plasmide modifié est ensuite réintroduit dans la bactérie, c'est ***la transformation***; cette opération peut être réalisée de plusieurs manières. Dans l'une d'entre elles, les bactéries sont rendues perméables à l'ADN étranger en les traitant à froid par du chlorure de calcium: elles sont dites alors *compétentes,* ce qui permet l'introduction du plasmide; une autre méthode, *l'électroporation,* plus efficace que la précédente, consiste à faire pénétrer le plasmide dans la cellule grâce à un choc électrique. Quelle que soit la méthode employée, les bactéries remises en culture se multiplient très rapidement, au rythme d'une division toutes les 30 minutes environ.

Le rendement des transformations est cependant très faible: une bactérie sur 10^5 en moyenne est transformée. C'est en raison du nombre élevé de bactéries dans le milieu et parce qu'elles se multiplient très rapidement (une génération toutes les 30 minutes environ) que la transformation est possible. Il faut cependant sélectionner celles ayant incorporé le plasmide parmi les milliards d'autres n'ayant pas accepté l'insert.

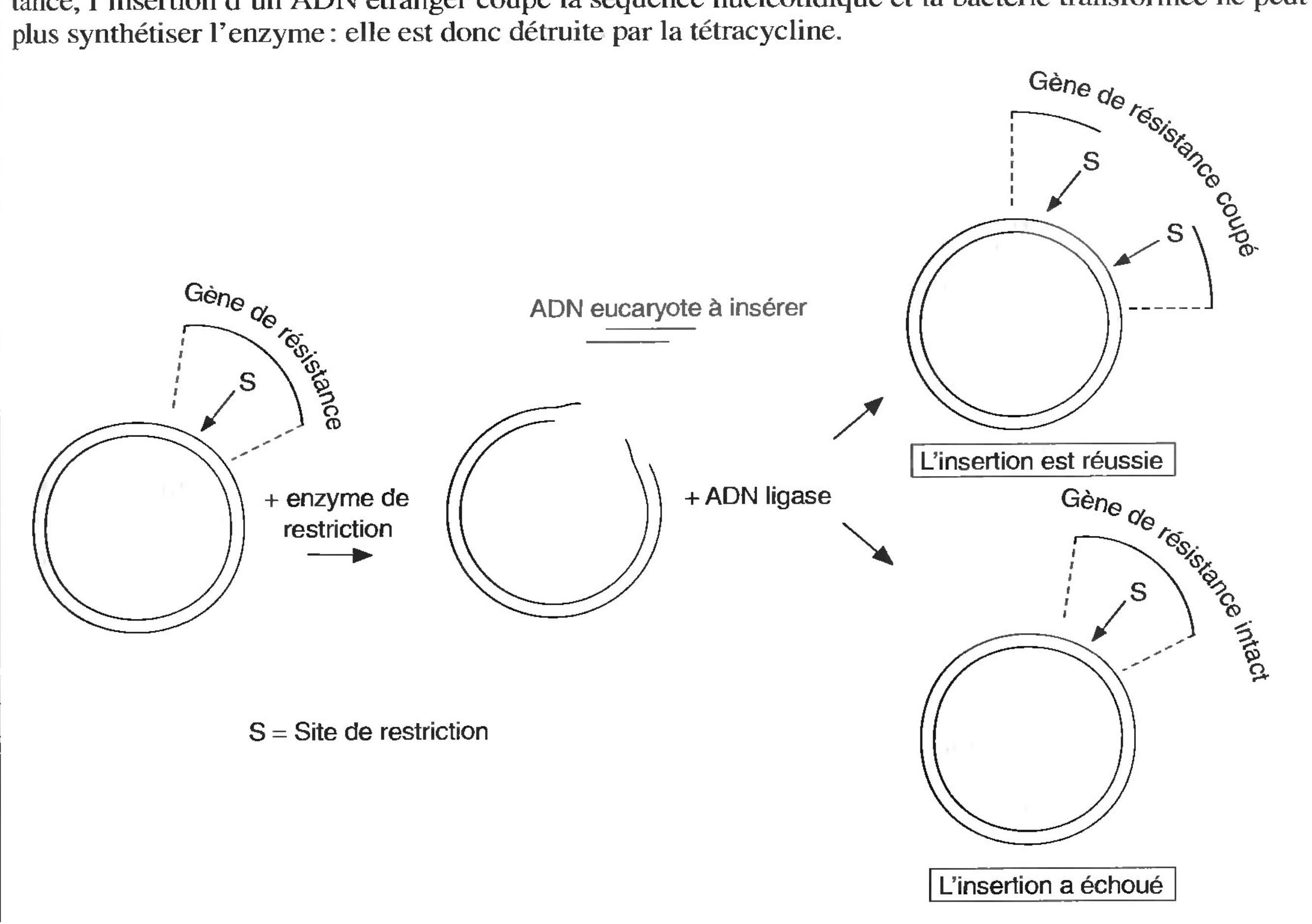
2. Sélection des bactéries transformées

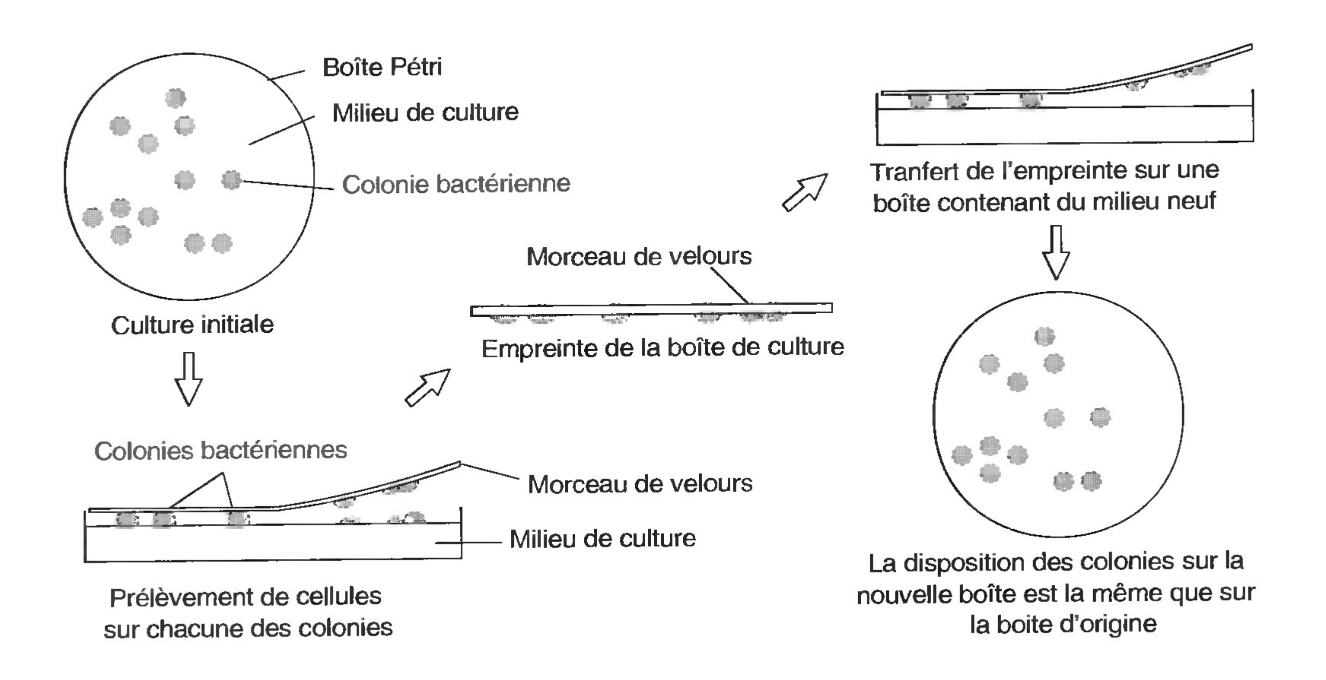
Le plasmide vecteur utilisé contient généralement deux gènes codant des enzymes détruisant des antibiotiques (ampicilline et tétracycline ou rifampicine et streptomycine, entre autres); le site de restriction employé pour insérer l'ADN étranger *doit être unique* et se trouver dans l'un de ces gènes de résistance, celui de la tétracycline par exemple.

Pour séparer les quelques bactéries recombinantes de celles n'ayant pas intégré le plasmide, on les cultive sur un milieu contenant de l'ampicilline: toutes les bactéries possédant le plasmide résisteront et se multiplieront normalement, les autres seront détruites.

Celles ayant résisté ont intégré le plasmide, mais tous les plasmides n'ont pas forcément inséré l'ADN étranger; il est donc nécessaire de procéder à une deuxième sélection.

Celle-ci est réalisée en cultivant les bactéries sur un autre milieu contenant le second antibiotique, la tétracycline. Comme le site de restriction est situé dans le gène codant l'enzyme qui permet la résistance, l'insertion d'un ADN étranger coupe la séquence nucléotidique et la bactérie transformée ne peut plus synthétiser l'enzyme: elle est donc détruite par la tétracycline.





Pour opérer cette sélection, on réalise, d'abord sur un milieu normal, des cultures où les bactéries sont très dispersées ; en se multipliant chaque bactérie donne naissance à une colonie où les cellules sont identiques puisqu'elles proviennent toutes de la même cellule initiale : *c'est un clone*. Ces clones sont plus ou moins séparés. On réalise alors de nouvelles cultures en respectant, dans les boîtes fraîchement ensemencées, la disposition initiale des clones. Le moyen le plus simple, pour réaliser cette reproduction à l'identique des boîtes de culture, est d'appliquer sur la boîte initiale un tissu en velours ; au niveau de chaque clone certaines bactéries adhèrent aux poils du tissu et peuvent être déposées sur un milieu neuf en un point qui correspond très exactement à la position occupée dans la boîte initiale : c'est la *réplique velours*. On peut ainsi, tout en respectant la disposition des clones les uns par rapport aux autres, ensemencer deux, voire plusieurs boîtes dont une contient l'antibiotique : chaque colonie peut ainsi être repérée avec précision. Il suffira alors de déterminer, en comparant les deux boîtes, quelles sont les bactéries qui ont été détruites par la tétracycline : *ce seront celles provenant d'une cellule où l'insertion d'ADN étranger a été réalisée*. On peut alors, à partir de la boîte dont le milieu ne contient pas d'antibiotique, prélever des cellules pour les multiplier et constituer des clones de bactéries transformées.

Cette méthode élégante est assez ancienne ; on utilise de préférence actuellement une méthode plus directe faisant appel à des plasmides comportant deux gènes particuliers : le premier est un gène de sélection permettant de ne conserver, si elles sont cultivées sur un milieu approprié (contenant un antibiotique par exemple), que les bactéries ayant incorporé le plasmide ; le second code une enzyme, la β-galactosidase, qui permet, dans certaines conditions, de colorer les bactéries en bleu par transformation d'un substrat incolore. C'est dans ce second gène qu'est inséré le fragment à cloner. On peut ainsi *en une seule culture* sélectionner les bactéries ayant accepté le plasmide (elles seront les seules à résister si le milieu contient l'antibiotique de sélection), et celles ayant intégré l'ADN à cloner dans le vecteur puisqu'elles ne seront pas colorées (contrairement à celles où le gène n'a pas été coupé par insertion qui seront teintées en bleu).

Les plasmides utilisés pour ces manipulations peuvent être obtenus à partir de bactéries : il s'agit des plasmides naturels, les premiers à avoir été utilisés ; ils sont dits de première génération.

On utilise plus généralement les plasmides artificiels, ou plasmides chimères, entièrement construits au laboratoire ; ils contiennent deux gènes de résistance aux antibiotiques, des sites uniques pour plusieurs enzymes de restriction localisées dans les gènes de résistance et une origine de réplication. Ce sont les plasmides de deuxième et troisième générations.

Le nombre de plasmides vecteurs par cellule peut varier sensiblement. Certains peuvent avoir un nombre élevé de copies par bactérie, ce qui peut paraître un avantage puisque l'ADN inséré peut être multiplié rapidement ; cependant la cellule peut réagir et provoquer des altérations de l'insert (délétions

par exemple). À l'inverse, d'autres plasmides vecteurs sont en nombre réduit par cellule (une ou deux copies), ce qui réduit la vitesse de multiplication de l'ADN mais correspond à des conditions plus physiologiques.

3. Les banques d'ADN

Une banque correspond à l'ensemble des fragments clonés à partir de l'ADN d'un tissu ou d'un organe d'une espèce. Elles sont à la disposition des chercheurs qui peuvent ainsi obtenir rapidement le gène nécessaire à leur étude puisqu'ils n'ont plus à procéder aux longues manipulations conduisant au clonage.

On distingue plusieurs types de banques.

– *Les banques génomiques* sont constituées à partir de fragments d'ADN provenant de la totalité du génome de l'espèce. Tous les gènes y sont représentés sous forme complète (exons et introns) ; elles contiennent également des séquences non codantes.

– *Les banques d'ADNc (ADN complémentaire ou cDNA)* sont élaborées à partir des ARN messagers d'un tissu ou d'un organe donné. On ne trouvera, dans ces banques, que les gènes exprimés dans le tissu à partir duquel elles ont été construites, ceux qui ont été transcrits en ARNm : une banque de tissu nerveux sera différente d'une banque de tissu musculaire de la même espèce. Il y a donc, pour un organisme donné, une banque d'ADNc par tissu ou par organe ; elles sont spécifiques d'un type cellulaire et caractérisent son état de différenciation.

– *Les banques d'oligonucléotides de synthèse* sont celles obtenues à partir d'ADN synthétisé *in vitro* à partir des informations fournies par la séquence des acides aminés d'une protéine purifiée.

Ces banques contiennent un grand nombre de gènes ; on peut alors en isoler un, c'est *le criblage*.

4. Le criblage

C'est la recherche, dans une banque, du clone contenant le gène désiré. C'est une étape cruciale et délicate pour laquelle plusieurs techniques ont été mises au point ; actuellement, deux sont couramment mises en œuvre.

– *L'utilisation d'oligonucléotides de synthèse radioactifs* (marqués au ^{32}P) construits à partir de la séquence des acides aminés de la protéine codée par le gène (ou, plus souvent, à partir d'une petite partie de cette protéine) ; connaissant la séquence des acides aminés, il est en effet possible de construire, en utilisant le code génétique, les différents polynucléotides possibles compte tenu de la dégénérescence du code (voir p. 233). Cet oligonucléotide de synthèse est alors une sonde qui peut être hybridée avec l'ADN extrait des différents clones.

– *L'utilisation d'anticorps* dirigés contre la protéine codée par le gène. Cette méthode suppose que l'ADN cloné soit inséré dans un vecteur qui puisse l'exprimer (souvent un virus), ce qui nécessite qu'il soit précédé par un promoteur (voir p. 201) dont on peut induire la mise en activité. Les clones produisent des protéines qui peuvent être adsorbées sur un filtre de nitrocellulose ; celui-ci est alors mis en contact avec l'anticorps puis soigneusement lavé. Seul l'anticorps associé à l'antigène (la protéine synthétisée) reste sur le filtre ; il est alors possible de le localiser par une méthode de coloration et ainsi d'identifier la position du clone sur la boîte de culture.

CHAPITRE III

La transcription de l'information génétique

Nous avons établi, au cours des précédents chapitres, la nature du matériel génétique; la question que nous devons maintenant nous poser est: comment est-il utilisé? En effet, les molécules d'ADN qui sont transmises de cellule-mère à cellule-fille, d'organisme-père à organisme-fils, contiennent la totalité de l'information génétique; le point important est donc de déterminer par quelle voie cette information, stockée au niveau du territoire nucléaire, dirige l'ensemble des activités cellulaires.

1. LE RÔLE DU NOYAU

Le noyau est indispensable pour le fonctionnement de la cellule. Des observations, ou des expériences simples, permettent de le démontrer. Ainsi, les hématies anucléées des mammifères ont une durée de vie très limitée. Les expériences de *mérotomie,* qui consistent à sectionner une cellule, une amibe par exemple, en fragments dont les uns possèdent un noyau et les autres en sont dépourvus, montrent que ceux qui sont nucléés se régénèrent parfaitement et mènent une vie normale alors que ceux qui sont anucléés ne survivent que quelques jours (6 à 14 jours); ils sont incapables de se mouvoir et cessent d'assimiler et de croître *(fig. III-1).*

Les expériences de transplantations réalisées chez les acétabulaires *(fig. III-2),* bien que déjà anciennes, sont intéressantes car elles constituent l'une des étapes ayant permis de préciser le mode d'intervention du noyau.

Les acétabulaires sont des algues unicellulaires pendant une partie de leur cycle de développement. De dimensions voisines du centimètre, elles sont remarquables par leur morphologie. Elles comportent, en effet, une base formée par des stolons qui fixent l'algue à son support dans l'eau de mer. Durant la période de leur vie où ces algues sont unicellulaires, le noyau (n) est situé dans un de ces

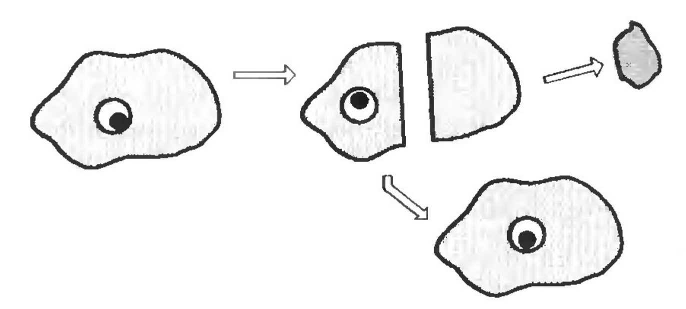


Fig. III-1 : Expérience de mérotomie chez une amibe.

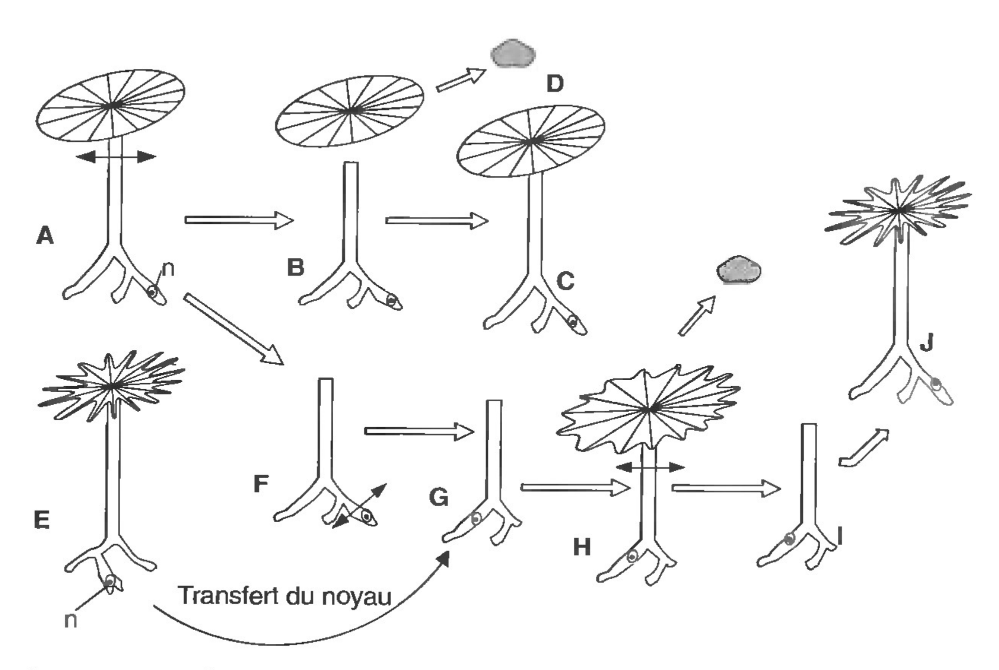


Fig. III-2 : Transplantation nucléaire chez les acétabulaires (le noyau de *A. crenulata* est représenté en rouge).

stolons *(fig. III-2, A)*. Au-dessus de cette base, un axe dressé se termine par une collerette de diverticules rayonnants qui constituent le chapeau ou ombrelle. Une expérience de mérotomie peut aisément être réalisée à partir de ces végétaux ; on sectionne l'axe ou pédicelle *(fig. III-2, B)* : le chapeau anucléé dégénère rapidement *(fig. III-2, D)* tandis que la partie basale, où se trouve le noyau, régénère un chapeau *(fig. III-2, C)*. Cette expérience complète celle réalisée avec l'amibe et confirme le rôle fondamental du noyau.

Il existe plusieurs espèces d'acétabulaires différant par la forme du chapeau : celui de l'acétabulaire de Méditerranée *(Acetabularia mediterranea)* est très faiblement indenté *(fig. III-2, A)*, celui de l'acétabulaire crénelée *(A. crenulata)* est fortement lobé *(fig. III-2, E)*. Ces deux espèces ont été utilisées pour des expériences de transplantation. On peut chez *A. mediterranea* sectionner l'axe, donc supprimer le chapeau et couper le stolon contenant le noyau *(fig. III-2, F)*. Pour éviter que l'axe anucléé dégénère, on peut transplanter un noyau dans un autre stolon. Si le noyau provient de *A. crenulata (fig. III-2, G)*, le chapeau régénéré après la greffe a une forme intermédiaire entre celui des deux espèces utilisées *(fig. III-2, H)*. Si l'on sectionne une deuxième fois l'axe, le second chapeau régénéré est typiquement celui de *A. crenulata (fig. III-2, I et J)*. HAMMERLING en 1934 déduisit de ce genre d'expériences qu'il existe des *substances morphogènes* issues du noyau qui persistent quelque temps dans le cytoplasme. Dans l'expérience précédente, la forme hybride du chapeau résulte de l'intervention de deux sortes de substances morphogènes, celles persistant dans le cytoplasme qui avaient été produites par le noyau de type *mediterranea* et celles de type *crenulata* produites par le noyau transplanté. Après la seconde excision, les premières substances morphogènes ayant été utilisées, seules celles de type *crenulata* sont capables d'induire la formation d'un nouveau chapeau.

Dans toute cellule la morphogenèse est étroitement liée aux protéines ; ces molécules interviennent en effet à deux niveaux : celui des structures puisqu'elles sont en grande partie responsables de l'architecture macromoléculaire du cytoplasme, celui des réactions biochimiques puisque les enzymes sont des protéines. On peut donc s'interroger sur le lien existant entre les protéines, molécules informationnelles qui exercent leur rôle dans le cytoplasme, et l'ADN qui est situé dans le noyau. Les protéines sont-elles synthétisées dans le noyau ou bien, si elles sont élaborées dans le cytosol, existe-t-il un intermédiaire entre noyau et cytoplasme ?

2. NÉCESSITÉ D'UN INTERMÉDIAIRE ENTRE LE NOYAU ET LE CYTOPLASME

Répondre à cette question consiste essentiellement à localiser le lieu de synthèse des protéines. Cela va nous permettre de nous familiariser avec une technique qui est très utilisée en biologie cellulaire, celle du *marquage radioactif*.

Le principe de la méthode est fondé sur *l'insolubilité des macromolécules, ici protéiques*. Les monomères de ces molécules, les aminoacides, sont par contre dissous dans le milieu aqueux cellulaire. Si l'on fournit à une cellule un acide aminé que l'on peut par la suite repérer, **c'est le précurseur**, il pénétrera à l'état dissous ; utilisé, comme les autres acides aminés, pour la synthèse d'un polypeptide, *il sera incorporé dans une macromolécule insoluble* qu'il permettra ensuite d'identifier.

Le moyen le plus simple pour marquer un monomère est de substituer à l'un de ses atomes d'hydrogène un isotope radioactif, le ***tritium***. Le noyau atomique du tritium est instable et sa désagrégation s'accompagne d'une émission de particules, des électrons, constituant un rayonnement β. Ce rayonnement peut être détecté par autoradiographie (voir p. 161).

La première difficulté dans une expérience de marquage radioactif intéresse ***le choix du précurseur***. Celui-ci doit être **spécifique**, c'est-à-dire *n'être utilisé que pour la synthèse de la macromolécule que l'on souhaite caractériser*.

Dans le cas qui nous intéresse, ce choix est simple puisque toutes les protéines, **et seulement les protéines**, sont formées d'acides aminés. Il suffit donc de choisir un acide aminé qui se rencontre dans presque toutes les protéines, comme la leucine, et de marquer ce précurseur par un atome de tritium.

L'expérience peut alors être conduite ainsi. On ajoute au milieu, où sont cultivées des cellules, de la ^{3}H leucine. Celle-ci est absorbée par les cellules qui ne distinguent pas le précurseur radioactif de la leucine normale (la leucine *froide*) ; elles l'incorporent alors dans les protéines en cours de synthèse (voir le mécanisme de cette synthèse p. 238 Au bout de quelques minutes*, on ajoute au milieu une solution fixatrice (glutaraldéhyde ou formaldéhyde tamponné à pH 7). Les cellules sont donc tuées et par conséquent toutes les réactions biochimiques, dont les synthèses protéiques, sont stoppées. Après cette fixation, les cellules sont traitées suivant les méthodes histologiques habituelles, c'est-à-dire qu'elles sont soigneusement lavées, déshydratées, incluses dans la paraffine et sectionnées en tranches de 7 μm d'épaisseur environ qui sont collées sur des lames de verre.

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont préparées pour l'autoradiographie (voir p. 161) : à l'obscurité, coulage d'une émulsion photographique. Après deux ou trois mois d'exposition à l'obscurité, les préparations sont révélées suivant les techniques photographiques usuelles.

Les grains d'argent, qui seront alors visibles au-dessus des sections, sont le résultat de l'interaction des rayons β et des ions contenus dans l'émulsion photographique : il y a donc *immédiatement sous ces grains* un ou plusieurs atomes de tritium appartenant à une molécule de leucine.

La leucine soluble, le précurseur, a été éliminée par la fixation, le lavage et tous les traitements qui ont suivi ; la seule leucine qui persiste dans les cellules est ***la leucine insolubilisée par son incorporation dans une macromolécule protéique***. Comme on a choisi un temps d'incubation court, on peut admettre que les protéines synthétisées n'ont pas eu la possibilité de se déplacer de manière importante dans la cellule, ce qui permet de situer le lieu de leur synthèse.

* Le temps d'incorporation doit être bref car, une fois synthétisées, les protéines se déplacent très rapidement dans la cellule.

Lorsqu'on examine les préparations, les grains d'argent sont strictement localisés au-dessus du cytoplasme, il n'y en a pas au-dessus du noyau : **le lieu de synthèse des protéines est donc le cytoplasme ; l'information génétique étant située dans le noyau,** ***l'ADN n'est pas la matrice sur laquelle vient s'ordonner la séquence des acides aminés ; il y a nécessairement un intermédiaire entre le noyau et le cytoplasme.***

3. NATURE DE L'INTERMÉDIAIRE ENTRE LE NOYAU ET LE CYTOPLASME

Cet intermédiaire doit répondre à deux conditions précises : 1) il doit se trouver à la fois dans le noyau et le cytoplasme ; 2) il doit être susceptible de stocker une information, celle qu'il recevra de l'ADN et qu'il transmettra aux protéines.

Le nombre de molécules susceptibles de remplir ces deux conditions est fort limité et l'acide ribonucléique, l'ARN, est le plus sérieux candidat. Ce qu'il convient de démontrer.

On peut le faire, là encore, en utilisant les molécules radioactives. Le premier point, fondamental, concerne toujours le choix du précurseur. Celui-ci doit, rappelons-le, être ***spécifique***, donc être présent uniquement dans l'ARN.

L'ARN est un polynucléotide, c'est-à-dire qu'il possède une organisation moléculaire fort comparable à celle de l'ADN. Deux différences notables existent cependant qui permettent de caractériser l'ARN : le sucre est le ribose et non le désoxyribose ; l'une des bases, l'uracile, ne se rencontre jamais dans l'ADN. On devrait donc pouvoir choisir entre ces deux molécules.

En fait, le ribose constitue un mauvais précurseur car, d'une part, il est très facilement isomérisé et, d'autre part, il entre dans la constitution d'un nucléotide triphosphorylé, l'ATP, dont nous avons vu qu'il joue un rôle important dans les échanges d'énergie et se rencontre dans tous les compartiments cellulaires.

L'uracile est donc le marqueur qu'il convient de retenir si l'on veut identifier une synthèse d'ARN. En réalité ce n'est pas la base uracile marquée par le tritium que l'on utilise pour ces expériences, mais le nucléotide qui en est dérivé : ***l'uridine tritiée.***

L'expérience visant à établir le rôle d'intermédiaire joué par l'ARN doit être effectuée en deux temps : d'abord démontrer que ce polynucléotide est bien synthétisé dans le noyau, ensuite établir qu'il est transféré dans le cytoplasme.

Le premier temps de l'expérience suit le même protocole que la méthode nous ayant permis de situer le lieu des synthèses protéiques.

À des cellules en culture, on donne de la ^{3}H uridine durant une dizaine de minutes. Les coupes sont ensuite fixées, ce qui arrête toutes les réactions de synthèse, puis lavées et prépa-

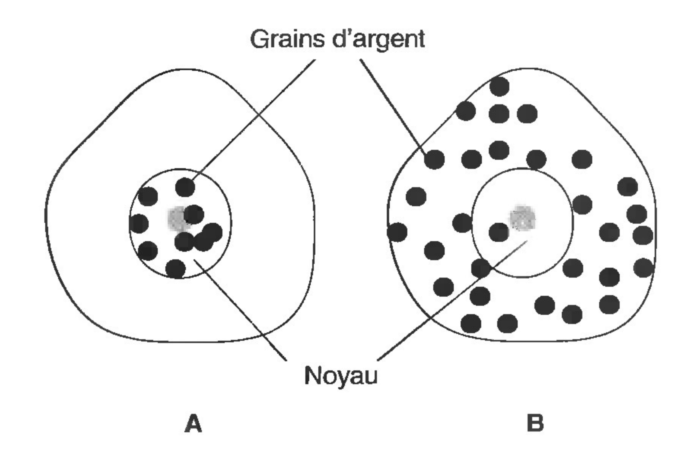


Fig. III-3 : Incorporation de ^{3}H uridine par les cellules.
A) Pulse simple.
B) Pulse suivi d'une chasse.

rées pour une autoradiographie. Après réalisation de celle-ci et développement, l'observation montre des grains d'argent strictement localisés au-dessus du compartiment nucléaire *(fig. III-3, A)*. Le raisonnement est le même que dans l'expérience précédente, seule l'uridine insolubilisée par une incorporation dans une macromolécule est restée dans les cellules et, le temps d'expérience étant bref, il n'y a pas eu de migration du polynucléotide; donc les synthèses ont bien lieu dans le noyau.

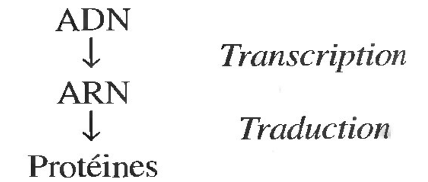
Le second temps de l'expérience implique la démonstration d'une migration du polynucléotide vers le cytoplasme.

L'expérience débute comme la précédente, c'est-à-dire que des cellules sont mises en contact pendant une dizaine de minutes avec la ^{3}H uridine, mais au terme de cette première période les cellules ne sont pas fixées. Elles sont simplement lavées très soigneusement, *ce qui élimine le précurseur radioactif soluble, non incorporé dans l'ARN*. Les cellules sont ensuite transportées dans un milieu neuf contenant de l'uridine froide (non radioactive) où elles séjournent pendant une heure, continuant à croître normalement. Elles sont ensuite fixées, lavées, sectionnées en coupes fines et une autoradiographie est réalisée. L'observation des sections montre alors des grains d'argent situés principalement au-dessus du cytoplasme *(fig. III-3, B)*.

Dans cette seconde expérience, le précurseur radioactif n'a été incorporé que pendant les dix premières minutes; à ce moment il est situé, comme le montre la première expérience, dans de l'ARN strictement intranucléaire. La seconde partie de l'expérience ne fait pas appel aux précurseurs radioactifs, mais à des précurseurs froids. La radioactivité décelée par autoradiographie en fin d'expérience ne peut donc correspondre qu'aux atomes incorporés durant les 10 premières minutes. Si, soixante minutes plus tard, ils sont localisables dans le cytoplasme, c'est que les polynucléotides ont migré de leur lieu de synthèse, le noyau, vers le cytosol, lorsque l'activité cellulaire se poursuivait en présence de précurseur froid. Il y a donc bien migration de l'ARN du noyau vers le cytoplasme; ce polynucléotide est bien l'intermédiaire recherché.

Cette seconde expérience est réalisée en deux temps qui n'ont pas la même signification: le premier correspond à la période où le précurseur radioactif est incorporé dans une macromolécule, c'est ***le pulse*** ; le second, effectué en présence d'un précurseur froid, permet de suivre le devenir de la molécule synthétisée pendant le pulse, c'est ***la chasse***.

L'existence d'un intermédiaire entre l'ADN et les protéines implique donc deux transferts d'information: la transcription et la traduction.



Ce schéma, qui rend compte du ***flux d'information*** à travers la cellule, est toujours orienté dans le même sens; il a longtemps été considéré comme **le dogme central** de la biologie moléculaire*.

Les molécules d'ARN sont cependant nombreuses et diverses dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique et n'ont pas toutes les mêmes caractéristiques. Les *ARN ribosomaux* sont des molécules bien caractérisées, dont le nombre de nucléotides est constant et qui sont très stables; ces caractéristiques sont bien entendu incompatibles avec la transmission de messages très différents au cours de la vie de la cellule. Les *ARN de transfert* sont de petites molécules, elles-mêmes très stables. La notion d'*ARN messager*, constitué par des molécules très diverses, à durée de vie limitée, fut introduite et démontrée dans les années 1960 ; c'est l'ARNm le véritable intermédiaire entre le noyau et le cytoplasme.

* Les rétrovirus font exception à ce flux d'information unidirectionnel puisqu'ils contiennent à l'intérieur de leur capside une enzyme, la transcriptase inverse, qui est capable de transcrire l'ARN, formant le génome de ces virus, en ADN. Cette enzyme est particulièrement intéressante pour les biologistes, notamment ceux qui mettent en œuvre les méthodes du « génie génétique », car elle permet de reconstituer à partir d'un ARNm extrait du cytoplasme d'une cellule la séquence d'ADN codante (voir p. 220).

4. LES MODALITÉS DE LA TRANSCRIPTION

La transcription correspond donc au transfert d'une information contenue dans la molécule d'ADN à une molécule d'ARN.

Les similitudes rencontrées dans l'organisation de ces deux macromolécules (polynucléotides longs, absence de ramifications, séquence latérale de bases azotées, possibilité d'établir des liaisons hydrogène entre bases) suggèrent un transfert direct d'information par synthèse d'une molécule complémentaire.

Cette synthèse nécessite une enzyme spécifique, susceptible d'*associer les nucléotides par des liaisons ester*; cette enzyme est une **ARN polymérase**. C'est une enzyme qui se rencontre dans toutes les cellules en quantité relativement abondante; on en compte environ 3000 dans une cellule d'*Escherichia coli*. Elle réalise une estérification entre l'hydroxyle du carbone $C_{3'}$ d'un nucléotide et le groupe phosphate porté en 5' par un autre nucléotide; le mécanisme se répétant, il est ainsi formé une série de liaisons phospho-diester; elle constitue, nous l'avons vu, le squelette d'un polynucléotide *(fig. III-4)*.

Cet enchaînement n'est toutefois pas aléatoire; il s'effectue par rapport à un polydésoxyribonucléotide, donc un brin de la molécule d'ADN. L'association des ribonucléotides est réalisée de telle manière qu'il y a *complémentarité structurale*, c'est-à-dire possibilité d'établissement de deux ou trois liaisons hydrogène entre bases complémentaires. Si l'on tient compte des différences existant entre les deux polynucléotides, les associations formées sont les suivantes:

Adénine - Uracile
Thymine - Adénine
Cytosine - Guanine
Guanine - Cytosine

ADN ARN

L'enzyme impliquée dans cette synthèse est donc une ***ARN polymérase-ADN dépendante***. Le mécanisme de copie est extrêmement précis; **l'ARN produit est complémentaire du brin d'ADN servant de matrice**.

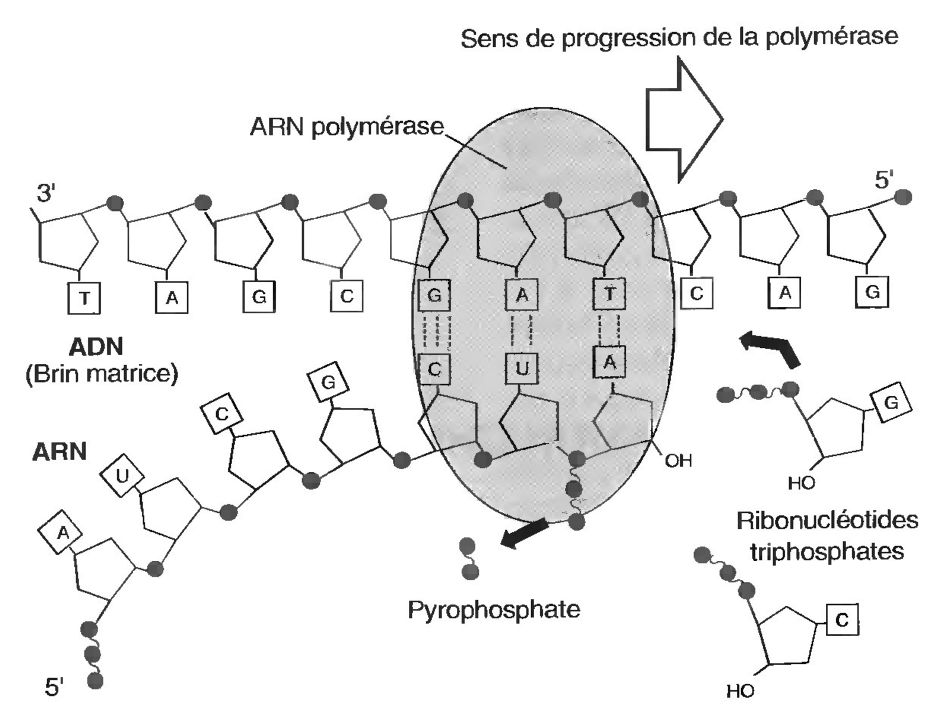


Fig. III-4 : Synthèse par une ARN polymérase d'un ARN complémentaire d'un brin d'ADN servant de matrice.

Il s'ensuit que la séquence de cet ARN est identique (à l'exception de l'uracile qui remplace la thymine) à celle du brin complémentaire du polynucléotide utilisé comme matrice; il porte la même information lue dans le sens 5' → 3'. C'est pourquoi ce brin d'ADN est appelé ***brin codant*** *(fig. III-5)*.

La formation d'une liaison ester nécessite un apport d'énergie, environ 6 Kcal. Celle-ci est fournie par les ribonucléotides eux-mêmes. Ce sont en effet des ribonucléosides 5' triphosphates qui sont utilisés par l'enzyme (cytidine triphosphate; uridine triphosphate; adénosine triphosphate ; guanosine triphosphate). L'hydrolyse d'une seule liaison riche en énergie de ces composés phosphorylés libère environ 7,3 Kcal; elle est donc suffisante pour réaliser l'estérification.

L'enchaînement des nucléotides pour la transcription nécessite donc un brin d'ADN servant de matrice, l'ARN polymérase, des ribonucléosides 5' triphosphates ; elle s'accompagne de la libération de groupements pyrophosphates (Pi~Pi).

L'ordre d'enchaînement des nucléotides peut théoriquement s'effectuer dans deux sens : soit par adjonction d'un nouveau nucléotide à l'extrémité 3'-OH d'un polynucléotide; soit par addition du nouveau nucléotide à l'extrémité 5' du polynucléotide en cours d'élaboration. L'incorporation de ribonucléotides tritiés (radioactifs) dans des cellules où la transcription est active montre que ces derniers sont toujours ajoutés à l'extrémité 3' de l'ARN en cours de synthèse.

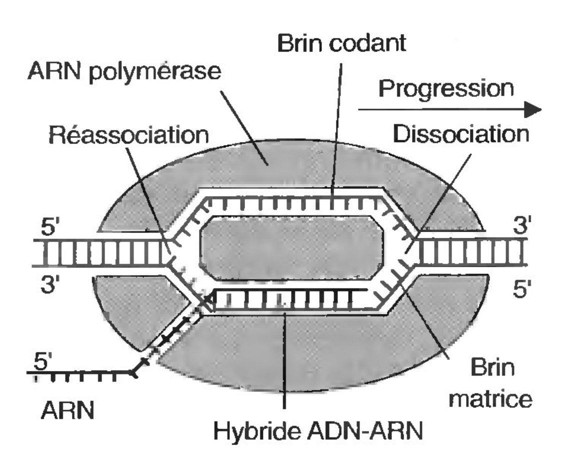


Fig. III-5 : Progression de l'ARN polymérase et formation d'un hybride ADN-ARN.

*La croissance de la molécule s'effectue toujours dans le sens d'**une progression de 5' vers 3'**, ce qui suppose que le brin d'ADN matrice est toujours celui orienté dans le sens 3' vers 5'.*

Cette synthèse suppose donc une ouverture locale de la molécule d'ADN lorsque l'ARN polymérase passe. Il y a pendant la période d'ouverture et de synthèse formation d'*un hybride ADN-ARN (fig. III-5)*; cette ouverture est temporaire, la double hélice d'ADN se reconstituant en effet immédiatement après l'enzyme, certainement parce que l'ADN est plus stable que l'hybride. En effet, si l'on dispose d'un ADN simple brin (d'origine virale) que l'on fait transcrire, c'est un hybride ADN-ARN qui est libéré par l'ARN-polymérase, hybride qui ne se dissocie pas. Dans les conditions normales, la conséquence intéressante de ce mode de progression est *la libération immédiate, dès sa formation, de la molécule d'ARN.*

5. LA TRANSCRIPTION CHEZ LES PROCARYOTES

5.1. NOTION D'UNITÉ DE TRANSCRIPTION

La transcription ne débute pas en un endroit quelconque de la molécule d'ADN ; l'ARN polymérase reconnaît un point où débute la synthèse, c'est *le site d'initiation*. Elle cesse en un point également identifié par l'enzyme, *c'est le site de terminaison*. Entre ces deux points, la molécule est transcrite en ARN, c'est l'*unité de transcription (fig. III-6)*.

Des facteurs protéiques complémentaires sont nécessaires pour que l'enzyme reconnaisse les sites d'initiation, c'est le facteur

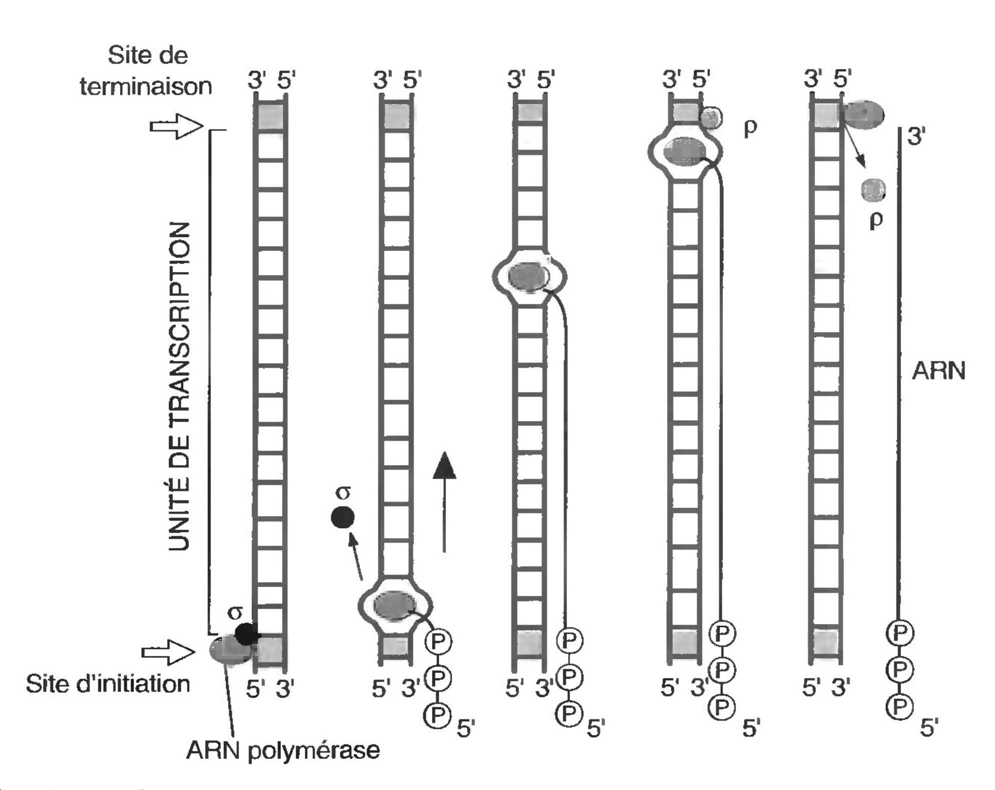


Fig. III-6 : Unité de transcription.
L'ARN polymérase lit le brin matrice de l'ADN dans le sens 3' vers 5'; l'ARN synthétisé, complémentaire du brin lu s'allonge donc dans le sens 5' vers 3'. L'extrémité 5' de cet ARN est identifiable par le groupement triphosphate du premier nucléotide mis en place et non utilisé pour une estérification.

sigma (σ), et de terminaison, c'est le facteur rho (ρ). La présence de ce dernier est toutefois, semble-t-il, moins constante que celle de σ.

La progression de l'ARN polymérase est extrêmement rapide puisque cette enzyme est capable d'enchaîner 50 à 60 nucléotides par seconde.

5.2. L'ARN POLYMÉRASE ET LA RECONNAISSANCE DU SITE D'INITIATION

L'ARN polymérase procaryote est une protéine volumineuse dont la masse moléculaire se situe autour de 500000 daltons ; elle est constituée par l'association de plusieurs sous-unités, le facteur sigma étant l'une d'entre elles. Elle est plus ou moins sphérique et recouvre une portion d'ADN d'environ 60 paires de bases, 40 en amont du site d'initiation et 20 en aval. Elle ne se lie que très faiblement à l'ADN en dehors du site d'initiation, et même au niveau de celui-ci, lorsque le facteur sigma est absent.

La reconnaissance du site d'initiation, c'est-à-dire du point précis où va débuter la transcription, ne s'effectue pas par rapport à un nucléotide ou une paire de nucléotides spécifique; elle tient à une organisation particulière de la portion d'ADN située immédiatement en amont du site d'initiation : c'est le **promoteur** *(fig. III-7, A)*.

La comparaison de nombreux promoteurs révèle l'existence des mêmes séquences aux mêmes endroits ; ce sont les *séquences consensus*. La première de ces séquences débute entre 5 et 10 paires de bases en amont du site d'initiation ; elle intéresse 6 nucléotides. Elle est caractérisée par la séquence des bases du brin codant, celui portant la même suite de nucléotides (l'uridine remplaçant toutefois la thymidine) que l'ARN qui sera produit. Sur ce brin codant, on note la présence d'une séquence de 6 nucléotides, TATAAT, très conservée chez tous les promoteurs (boîte Pribnow, *pribnow box*). La seconde séquence est séparée de la

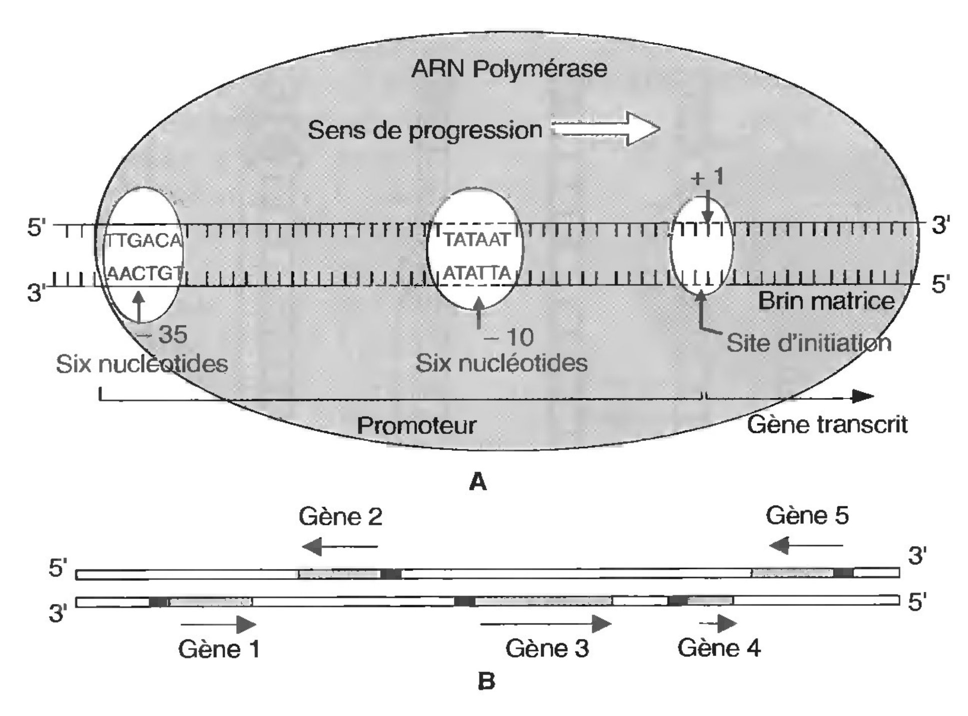


Fig. III-7 : Promoteur et transcription chez les Procaryotes.
A) Organisation d'un promoteur procaryote.
B) Sens des transcriptions (les promoteurs sont figurés en rouge).

première par 17 nucléotides et correspond généralement à 6 paires de bases. Le promoteur est donc constitué de 35 à 40 paires de nucléotides.

L'existence de ces deux séquences consensus permet à l'ARN polymérase, à laquelle s'est associé le facteur sigma, de reconnaître sans ambiguïté le point où doit démarrer la transcription. Il convient de noter qu'il s'agit, là encore, d'**une reconnaissance stéréo-spécifique** dans laquelle la structure spatiale de la protéine enzymatique est directement impliquée.

Il convient également de préciser que la reconnaissance et la fixation de l'ARN polymérase sont souvent facilitées par la très légère ouverture de la double hélice produite au niveau des séquences consensus ; nous avons vu en effet (p. 166) que l'ADN procaryote est maintenu sous une forme surenroulée négative par une enzyme, l'ADN-gyrase, et que ce surenroulement a tendance à dissocier les deux brins de l'ADN là où ils sont le moins solidement liés, c'est-à-dire au niveau des portions riches en adénine-thymine.

Le promoteur détermine par sa position sur l'un ou l'autre brin de la molécule d'ADN le sens de transcription sur le chromosome bactérien. En conséquence, le long d'un même chromosome, on aura certains gènes qui seront lus sur un brin, d'autres sur l'autre, mais toujours dans le sens de lecture 3'→5' pour l'ARN polymérase *(fig. III-7, B).*

Le taux de transcription d'un gène, c'est-à-dire d'une séquence d'ADN particulière, n'est pas nécessairement fixe ; il est au contraire très souvent régulé par la cellule, en fonction de ses besoins. Cette régulation est le fait de protéines, dites *protéines régulatrices*, qui se lient à l'ADN près du promoteur, limitant (elles sont alors inhibitrices) ou favorisant (elles sont dans ce cas activatrices) l'accès de l'ARN polymérase au promoteur. La portion d'ADN à laquelle se lient ces protéines régulatrices, située le plus souvent en avant du promoteur, constitue l'opérateur (voir p. 248).

5.3. LA PROGRESSION ET LA TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION

Le premier nucléotide mis en place à l'extrémité 5' de la molécule est toujours un nucléotide purique, le plus souvent une adénosine. *Chez les Procaryotes, il est toujours identifiable car l'extrémité 5' porte trois phosphates*; ce sont les groupements phosphorylés du premier nucléoside triphosphate qui n'ont pas été utilisés pour l'estérification comme le sont ceux des nucléotides qui suivent *(fig. III-4 et 6)*.

Au cours de la progression de la transcription, la molécule d'ADN est ouverte sur une longueur de 17 paires de bases, c'est la *bulle de transcription*, mais l'hybride ADN-ARN n'intéresse que 12 paires de bases. La séparation des polynucléotides est donc très brève.

La reconnaissance du site de terminaison implique très souvent l'association d'un facteur complémentaire, le facteur rho, à l'ARN polymérase; sa présence n'est cependant pas toujours nécessaire. La fin de la transcription est en effet marquée par l'existence d'une suite particulière de nucléotides *(fig. III-8)*. Il s'agit de deux séquences inversées (structures palindromiques) séparées par quelques bases. Lorsque ces séquences sont transcrites, la molécule d'ARN se replie sur elle-même, formant ce que l'on appelle une épingle à cheveux, par établissement de liaisons hydrogène entre bases complémentaires; *la molécule d'ARN est alors localement en double hélice*. La molécule d'ADN se referme ensuite et la polymérase est rejetée.

5.4. LOCALISATION ET VISUALISATION DES SYNTHÈSES CHEZ LES PROCARYOTES

Les étalements moléculaires de nucléoïde bactérien montrent très souvent des images de transcription, que ce soit d'ARN ribosomal, d'ARN de transfert ou, comme sur la *figure III-9*, d'ARN messager; en effet, ces gènes codant pour ces ARN différents se suivent sur la molécule d'ADN circulaire.

Deux points intéressants doivent être notés. Le premier concerne les ARN polymérases; elles sont généralement plusieurs à transcrire la même unité de transcription et les ARN formés s'allongent régulièrement d'une extrémité à l'autre dans la région observée, indiquant que c'est toujours le même brin d'ADN qui est transcrit. Le second point concerne le devenir des ARN.

Les ARN de transfert et les ARN ribosomaux sont transcrits sous forme d'ARN prétransfert et d'ARN préribosomal. Ce dernier provient de la transcription d'**un gène répété 7 fois** sur le nucléoïde. Il comporte environ 6500 nucléotides et a un coefficient de sédimentation de 30S; c'est après sa libération de la matrice d'ADN que des nucléases coupent

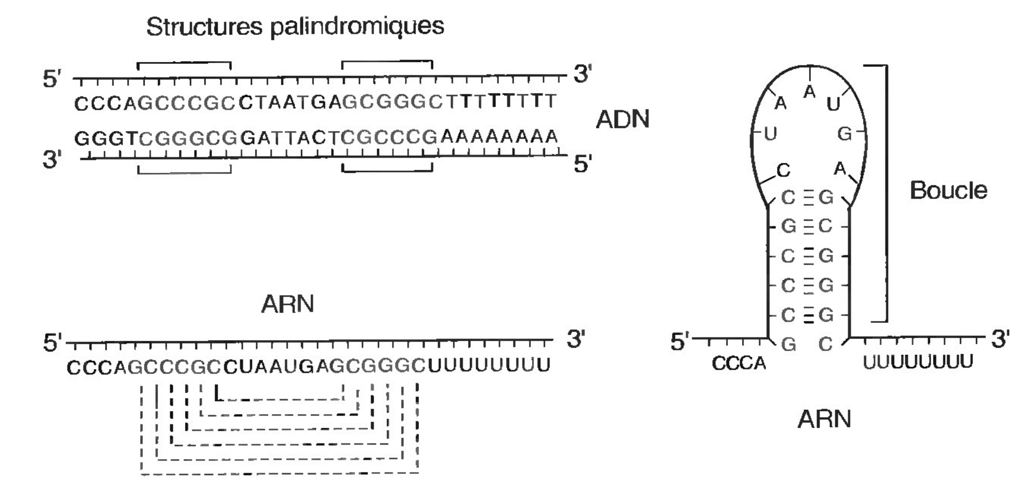


Fig. III-8 : Organisation du site de terminaison.

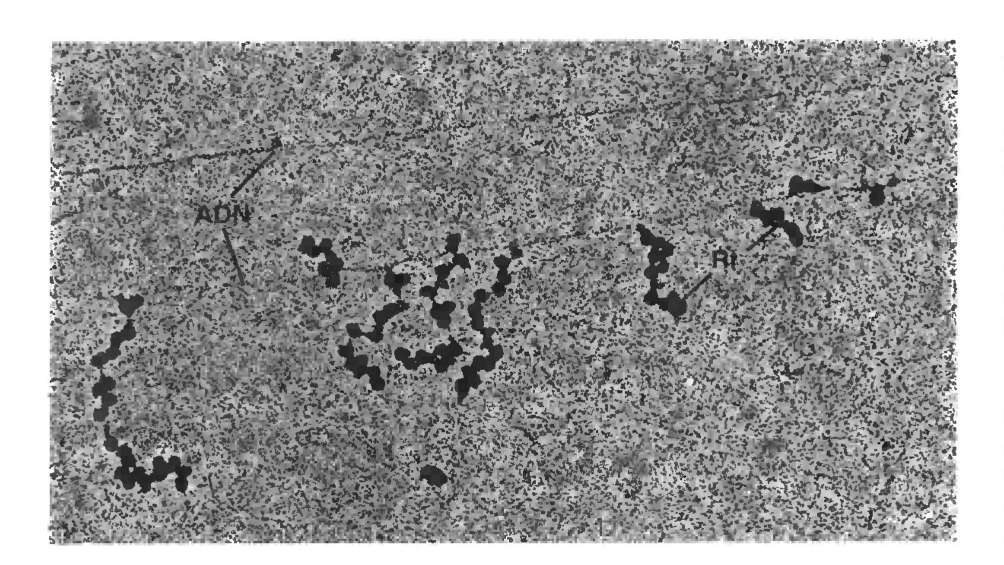


Fig. III-9 : Étalement moléculaire d'un nucléoïde bactérien, celui d'*Escherichia coli* montrant la transcription d'un brin d'ADN.

Les ribosomes (Ri) s'associent à l'ARNm dès sa formation. Bien visibles sur ce cliché, ces ribosomes, de plus en plus nombreux sur l'ARNm, permettent de suivre la progression de la transcription le long d'une unité de transcription. G. x 60 000.

(Reproduit de O.L. MILLER. The visualization of genes in action. Scientific American 1973 ; 228: 34-42.)

cette molécule en fragments plus petits *(fig. III-10)*, trois ribosomaux de 23S, 16S et 5S et un ARN prétransfert ; des fragments sont éliminés au cours de cette opération. Le processus, bien que moins complexe, est identique en ce qui concerne les ARN prétransferts autres que celui inclus dans l'ARN préribosomal. En ce qui concerne les ARN ribosomaux et les ARN de transfert, il existe donc chez les Procaryotes ***un métabolisme post-transcriptionnel***.

Le mécanisme est différent pour les ARN messagers. La synthèse débutant par l'extrémité 5', c'est cette extrémité qui se détache d'abord de l'ADN ; or, on se souvient que, chez les Procaryotes, les domaines du nucléoïde sont largement étalés dans le cytosol puisqu'il n'y a pas d'enveloppe nucléaire. Les ribosomes peuvent donc très aisément se fixer à cette extrémité 5' et commencer immédiatement la traduction *(fig. III-9 et 11)* ; l'élongation de l'ARN se poursuivant, le ribosome progresse tandis que le polypeptide est élaboré ; un deuxième, puis un troisième ribosome peuvent alors se lier à l'ARN en cours de transcription, lisant l'information au fur et à mesure qu'elle est disponible et donnant les images caractéristiques observées sur les clichés *(fig. III-9)*.

Chez les Procaryotes, la traduction des ARNm est donc couplée à la transcription. Il n'y a pas de modification de l'ARN avant sa traduction en protéine ; *il n'y a pas de modifications post-transcriptionnelles*. La séquence d'acides aminés du polypeptide formé correspond à la totalité de l'information contenue dans l'ADN *(fig. III-12)*.

Chez les Procaryotes il y a colinéarité gène-protéine, c'est-à-dire que, connaissant la séquence des aminoacides d'un polypeptide, on peut par simple conversion, à l'aide du code génétique (p. 233), reconstituer la séquence des nucléotides de l'ARNm et celle des nucléotides de l'ADN.

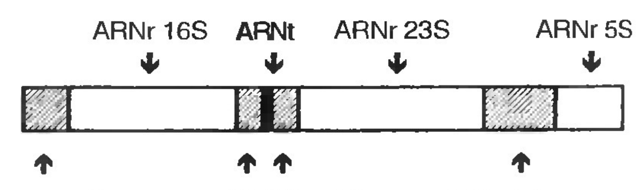


Fig. III-10 : Métabolisme post-transcriptionnel des ARN ribosomaux procaryotes.

Le transcrit primaire est coupé par des enzymes spécifiques ; certains fragments sont éliminés, les autres sont les ARNr. Chez les Procaryotes, un ARN de transfert est intégré à ce transcrit primaire.

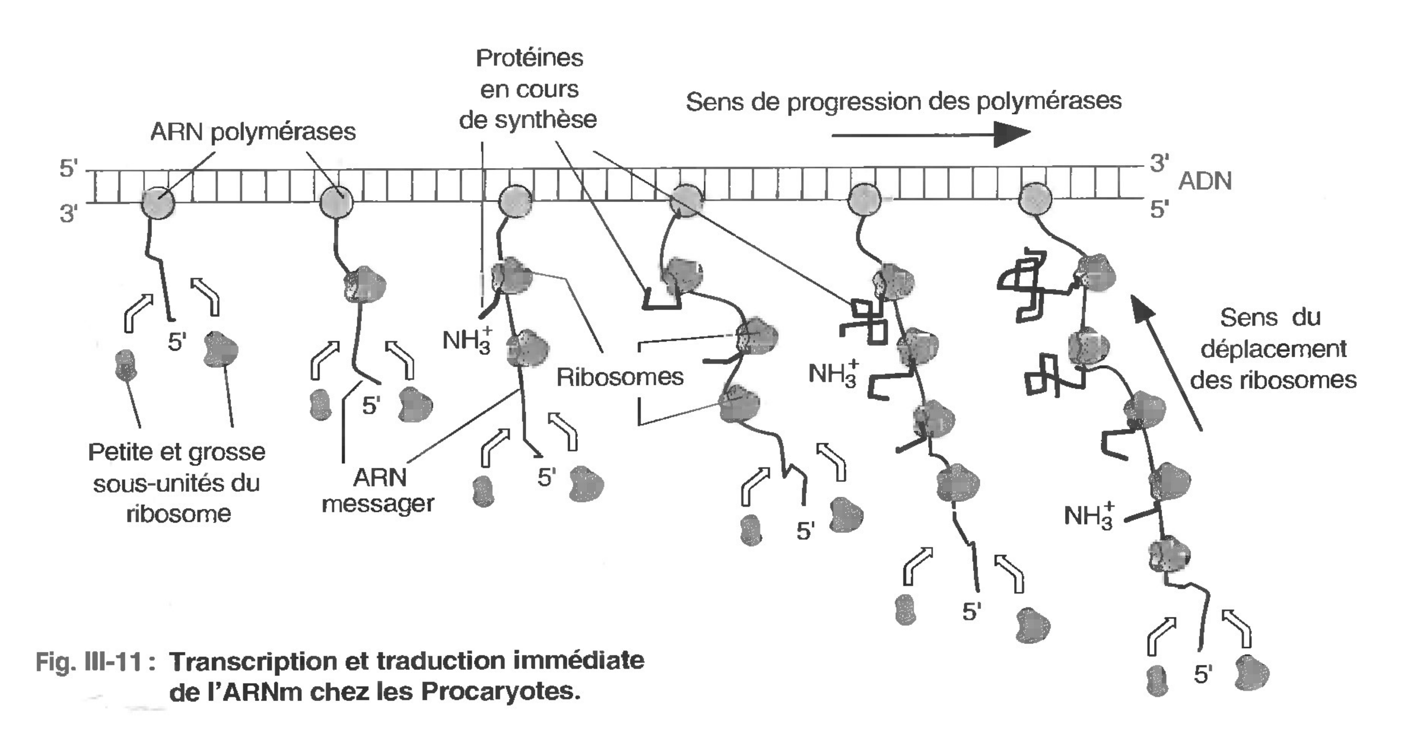


Fig. III-11 : Transcription et traduction immédiate de l'ARNm chez les Procaryotes.

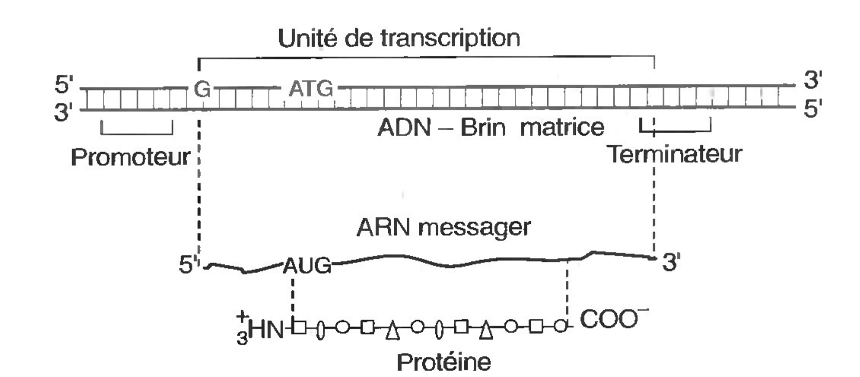


Fig. III-12 : Unité de transcription, ARNm et protéines chez les Procaryotes.

6. LA TRANSCRIPTION CHEZ LES EUCARYOTES

La présence d'une enveloppe nucléaire, isolant le compartiment où sont réalisées les transcriptions de celui où sont effectuées les traductions, ainsi qu'une information plus abondante et plus diversifiée permettent bien entendu de prévoir que les synthèses d'ARN chez les Eucaryotes sont sensiblement différentes de celles rencontrées chez les Procaryotes, bien que le principe soit, au niveau moléculaire, fondamentalement le même.

6.1. ARN POLYMÉRASES ET UNITÉS DE TRANSCRIPTIONS

Ces enzymes sont, comme chez les bactéries, des protéines volumineuses dont la masse moléculaire se situe autour de 500 000 daltons mais, alors que la même ARN polymérase transcrit la totalité du génome bactérien, ***trois ARN polymérases différentes interviennent***

chez les Eucaryotes, chacune correspondant à une catégorie de gènes :

– l'ARN polymérase I transcrit les gènes ribosomaux (à l'exclusion de celui de l'ARNr 5S) ;
– l'ARN polymérase II transcrit les ARN messagers ;
– l'ARN polymérase III transcrit les ARN de transfert, l'ARN ribosomal 5S et d'autres petits ARN.

Ces trois enzymes ont des propriétés très différentes ; ainsi, l'α-amanitine, toxine extraite d'un champignon mortel, l'amanite phalloïde, bloque la transcription des ARNm en se liant très fortement à l'ARN polymérase II ; elle interfère très légèrement avec l'ARN polymérase III et ce sont seulement ses fortes concentrations qui stoppent les synthèses d'ARNt ; elle est par contre sans effet sur la production des ARNr, la polymérase I étant insensible à son action.

6.2. ARN POLYMÉRASES ET SITES D'INITIATION

Contrairement à ce qui se produit chez les Procaryotes, où les ARN polymérases sont capables de reconnaître parfois seules le promoteur, la formation d'*un complexe de pré-initiation* est indispensable chez les Eucaryotes. La formation de ce complexe implique des interactions ordonnées d'un **ensemble de facteurs d'initiation** associés à la polymérase.

Les gènes codant pour les protéines de la cellule eucaryote diffèrent de ceux de la cellule procaryote ; ils comprennent en effet trois régions distinctes : la partie codante commençant au site d'initiation et s'achevant au site de terminaison ; le site promoteur situé à proximité de la région codante ; et un site régulateur, *dont la localisation est variable*, auquel se fixent des protéines qui intensifient ou réduisent la production d'ARNm. Dans ce chapitre consacré à la transcription, c'est le promoteur qui sera étudié ; le site régulateur sera étudié dans un autre chapitre (p. 256).

Le promoteur des ARN messagers des Eucaryotes et les complexes de pré-initiation qui s'y associent, ceux de la polymérase II, sont les mieux connus. Le promoteur comporte deux régions *(fig. III-13)*. La première est une courte séquence située en amont, entre –25 et –30 pb du site d'initiation, sur le brin codant (qui ne sert pas de matrice) ; c'est la boîte TATA ; elle ressemble à celle décrite chez les Procaryotes, mais elle est plus éloignée du site d'initiation ; cette boîte correspond à *la zone de fixation du complexe de transcription* ; la mutation d'une seule base dans cette région modifie fortement l'activité promotrice. Cette boîte est insuffisante pour assurer un fonctionnement normal du promoteur, entre autres pour assurer l'exact positionnement du complexe de transcription. Elle est complétée par une seconde région, une séquence complémentaire située entre –110 et –140 pb du site d'initiation. Cette seconde séquence est moins uniforme que la première ; ce peut être en effet une boîte CAAT (constituée par la séquence $^{5'}$GGNCAATCT$^{3'}$ dans laquelle N peut correspondre à C ou T) que l'on rencontre dans les gènes qui ne sont pas exprimés continuellement, c'est-à-dire ceux dont le fonctionnement est régulé, ou une boîte CG ($^{5'}$GGGCGG$^{3'}$) pour ceux qui sont transcrits en permanence. D'autres séquences complémentaires ont également été identifiées.

In vitro, l'ARN polymérase II ne peut pas seule reconnaître ces sites promoteurs et démarrer la transcription ; pour que celle-ci commence, il faut ajouter au milieu expérimental des extraits cellulaires ; ceci indique qu'il y a parmi ceux-ci des facteurs complémentaires indispensables : ce sont les facteurs de transcription, TF II (de l'anglo-saxon ***Transcription Factors***, et II pour polymérase II).

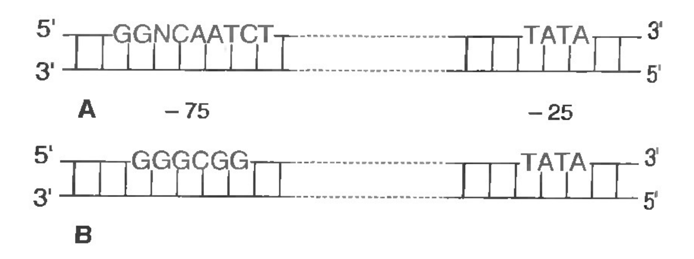


Fig. III-13 : Organisation du promoteur des ARNm d'Eucaryotes.

A) Dans le cas de gènes dont le fonctionnement est régulé (N correspondant soit à C, soit à T).
B) Dans le cas de gènes transcrits continuellement.

Ces facteurs ont été l'objet de nombreuses études au cours des dernières années; on en a isolé un certain nombre dont la séquence polypeptidique est maintenant connue. Cinq d'entre eux participent au démarrage de la transcription des ARNm; ce sont TF II A, TF II B, TF II D, TF II E et TF II F qui viennent s'adjoindre à la polymérase II.

Ces différents facteurs présentent entre eux certaines similitudes de séquences; ils en présentent également avec le facteur des Procaryotes, ce qui suggère l'existence d'une possible filiation entre ces composés.

Parmi ces différents facteurs, seul TF II D possède une composante susceptible d'assurer la liaison avec l'ADN au niveau de la boîte TATA: c'est la **TBP** (***Tata Binding Protein,*** c'est-à-dire protéine de liaison à la boîte TATA), une des protéines constituant TF II D. TF II D est donc l'élément clef et se fixe le premier *(fig. III-14, A)*; les autres facteurs viennent ensuite s'y associer dans un ordre déterminé: D + A → [D-A] + B → [D-A-B] + ARN polymérase II → [D-A-B-Poly II] + F → [D-A-B-Poly II-F] → complexe de pré-initiation fonctionnel *(fig. III-14, A à D).*

Une fois ce volumineux complexe (1.10^6 daltons) constitué, la transcription peut commencer au site d'initiation. De nombreux points restent cependant à préciser; on ignore toujours, par exemple, si ce volumineux complexe conserve son organisation, c'est-à-dire si tous les facteurs accompagnent la polymérase durant la transcription ou bien si certains s'en détachent lorsque celle-ci a commencé. On pense que TF II D se dissocie rapidement de la polymérase; il pourrait ainsi laisser libre l'accès d'un nouveau facteur à la boîte TATA ou, s'il demeure lié à celle-ci, fixer immédiatement une seconde polymérase autorisant ainsi une transcription accélérée.

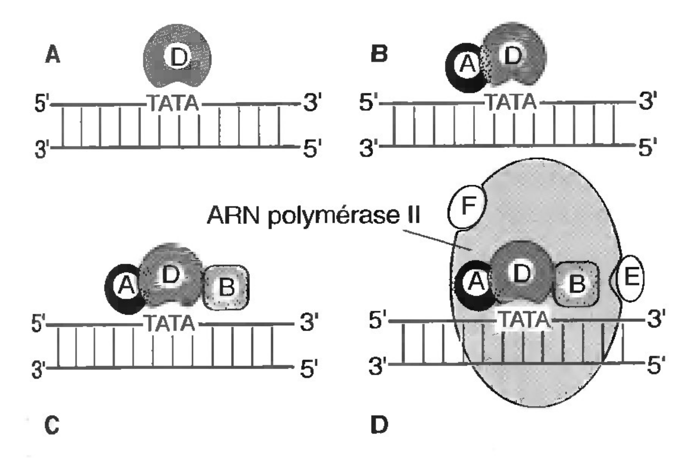


Fig. III-14: Fixation progressive des différents facteurs de transcription associés à l'ARN polymérase II pour former le complexe de pré-initiation.

La fixation de la polymérase et des facteurs protéiques est en outre régulée (rappelons-le) par un nombre plus ou moins élevé de molécules activatrices et inhibitrices (p. 257).

Le promoteur des gènes lus par les autres polymérases est moins bien connu. Il y a toujours, bien entendu, des séquences consensus reconnues par des complexes d'initiation dans lesquels interviennent des facteurs de transcription associés à l'enzyme. Le promoteur des gènes transcrits par l'ARN polymérase III, par exemple, est moins précisément défini que celui des ARNm; en effet les séquences consensus peuvent être situées à différents emplacements, y compris à l'intérieur du gène transcrit; quant aux facteurs de transcription, ils sont généralement moins nombreux mais il paraît établi que TBP, la protéine de fixation, est également présente. Ce serait un facteur universel de transcription.

Par ailleurs, l'organisation du matériel génétique en nucléofilament affecte les modalités de la transcription. Le domaine, ou boucle de chromatine, contenant le ou les gènes transcrits possède une conformation modifiée. *Le nucléofilament n'est plus enroulé en solénoïde serré* et la file ordonnée des nucléosomes est vraisemblablement interrompue par des segments d'ADN dépourvus d'histones. Le cœur nucléosomique, très stable aux concentrations ioniques de la cellule, constitue en effet un sérieux obstacle à la transcription. Pour que celle-ci puisse avoir lieu, il est nécessaire que l'ARN polymérase accède aux deux brins de la molécule d'ADN, c'est-à-dire qu'il faut une désorganisation locale et temporaire de la structure nucléosomique.

On pense actuellement que le déplacement du nucléosome s'effectue en plusieurs étapes. La première, la déstabilisation du cœur, pourrait être réalisée par certains des facteurs de transcription s'associant à la fois à l'ADN et aux histones, formant ainsi des complexes ter-

naires, association facilitée par une acétylation (voir p. 180) de ces protéines basiques. Le passage de la polymérase dissocierait alors progressivement le complexe, d'abord les dimères H_{2A}-H_{2B} puis le tétramère H_3-H_4. Les histones déplacées seraient transférées sur des molécules acceptrices qui participeraient à la reconstitution du cœur immédiatement après le passage de l'enzyme, c'est-à-dire pratiquement à l'endroit où il était situé. On ignore actuellement la nature exacte de ces molécules d'accueil mais, comme elles participent à la réorganisation du cœur, on évoque, sans toutefois en avoir la preuve, des molécules chaperons comme la nucléoplasmine.

6.3. LA LOCALISATION INTRANUCLÉAIRE DES SYNTHÈSES

Plusieurs approches expérimentales permettent de localiser les sites de synthèse à l'intérieur du noyau.

A. Marquage radioactif

Lorsque de l'uridine tritiée est fournie à des cellules en culture, pendant un temps très bref (pulse de quelques minutes), et que l'autoradiographie qui suit est réalisée dans des conditions telles que l'observation puisse être effectuée en microscopie électronique, on observe un marquage nucléaire inégalement réparti.

Les grains d'argent sont situés principalement au niveau du nucléole et, en moins grand nombre, au-dessus de la chromatine dispersée, en périphérie de la chromatine condensée.

Ces expériences ne permettent pas, cependant, d'attribuer à chaque territoire nucléaire une fonction particulière.

B. Étude de mutants

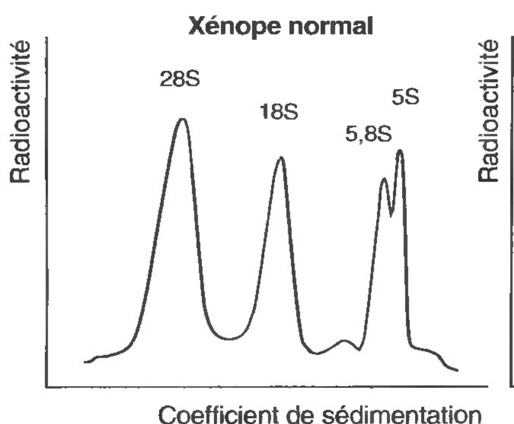
En 1958 on identifia chez un crapaud africain, le xénope, *Xenopus*, une mutation portant sur le nombre des nucléoles. Dans cette espèce, en effet, chaque noyau cellulaire contient deux nucléoles; les mutants isolés en comportent un seul.

Ces mutants sont hétérozygotes car, chez les homozygotes, la mutation est létale, la mort survenant au cours des premiers stades de développement. On a cependant pu constater que, *dans les cellules de ces embryons homozygotes, il n'y a aucun nucléole.*

La fourniture d'uridine tritiée aux cellules de ces jeunes larves homozygotes et à celles de larves normales permet, en comparant les molécules radioactives isolées, d'établir le lien existant entre l'absence de nucléole et les synthèses d'ARN *(fig. III-15).*

Alors que les organismes normaux synthétisent les 4 types d'ARN ribosomaux présents normalement chez les Eucaryotes, les larves mutées homozygotes n'en élaborent qu'une catégorie, celle des ARN 5s.

La plupart des ARNr (28S, 18S, 5,8S) sont donc synthétisés dans le nucléole, un seul (5S) étant produit dans un autre territoire nucléaire; il n'est bien entendu pas affecté par la mutation.



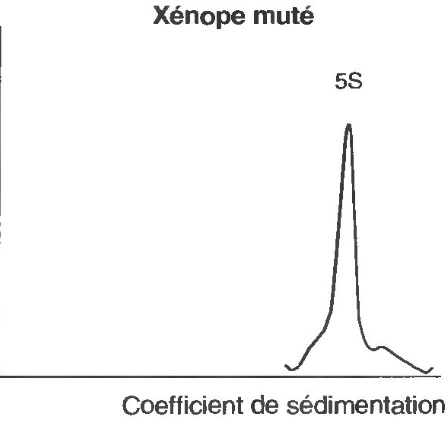


Fig. III-15 : Détermination des ARN ribosomaux présents dans les cellules des xénopes normaux et des xénopes mutés chez qui les nucléoles sont absents.

C. Les hybridations moléculaires in situ

On peut, en fonction de leurs caractéristiques moléculaires, séparer les ARNm, les ARNt et les ARNr d'une cellule eucaryote. Si les cellules utilisées pour cette extraction ont été cultivées sur un milieu contenant de la ^{3}H-uridine, ces ARN sont radioactifs ; on peut donc les identifier.

À partir des mêmes cellules, on peut isoler l'ADN. Les deux brins de cette molécule peuvent être séparés par un agent dénaturant. Si cet agent dénaturant est supprimé, les brins d'ADN se réassocient en respectant la complémentarité des bases : c'est la renaturation.

Si on ajoute à cet ADN dénaturé des molécules d'ARN, il peut également y avoir formation d'un hybride ADN-ARN dans la mesure où les séquences des deux polynucléotides sont rigoureusement complémentaires, c'est-à-dire que *l'ARN ne peut s'associer pratiquement qu'avec le brin d'ADN ayant servi de matrice, c'est-à-dire celui utilisé pour sa synthèse*. Cette technique d'hybridation (voir encadré p. 210) permet donc, avec un ARN marqué, de retrouver, dans un mélange de molécules d'ADN dénaturé, le gène ayant été utilisé pour la transcription.

Cette méthode peut être employée *in situ*, c'est-à-dire sur coupe. La dénaturation chimique de l'ADN est effectuée sur des préparations étalées sur lame ; elles sont ensuite recouvertes par la molécule d'ARN radioactive dont on veut localiser le lieu de synthèse, ***c'est la sonde***. Si l'ADN ayant codé cet ARN est accessible, c'est-à-dire s'il se trouve à la surface de la coupe, l'hybridation est possible ; cet hybride est radioactif, puisque la sonde utilisée l'est, il pourra donc être localisé par autoradiographie.

Cette technique, dont la mise en œuvre est fort complexe, est actuellement très utilisée dans les laboratoires. Elle a permis de localiser les gènes assurant les synthèses d'ARN ; ils sont identifiables dans deux territoires nucléaires.

Dans les nucléoles, où sont élaborés les ARN ribosomaux 28S, 18S et 5,8S.

Dans la chromatine dispersée, de préférence à la périphérie de la chromatine condensée, où sont transcrits les ARN messagers, les ARN de transfert et l'ARN ribosomal 5S.

6.4. LA TRANSCRIPTION NUCLÉOLAIRE

Le nucléole est un organite intranucléaire, non limité par une membrane ; rappelons qu'il est constitué par 3 territoires distincts *(fig. III-16 et 17)* : le centre fibrillaire, la zone fibrillaire dense, la zone granulaire dont l'importance et la répartition sont variables d'une cellule à l'autre, puisque ces caractéristiques dépendent notamment de l'activité métabolique. Il s'ensuit que l'aspect du nucléole peut être fort variable.

A. Visualisation des transcriptions nucléolaires

Les ovocytes d'amphibien, notamment ceux du xénope, *Xenopus*, ont un noyau volumineux contenant de très nombreux nucléoles à localisation périphérique.

L'extraction de ces nucléoles est relativement aisée et l'on peut, à l'aide de techniques appropriées, étaler leur partie fibrillaire sur une grille destinée aux observations en microscopie électronique *(fig. III-18 et 19)*.

On observe alors des filaments plus ou moins circulaires portant des rangées de fibrilles de longueur croissante ; cette organisation, dite « *arbre de Noël* », est répétée plusieurs fois avec une disposition en *tandem*, c'est-à-dire que ces arborescences sont disposées les unes à la suite des autres *(fig. III-18)*.

L'utilisation d'enzymes permet de comprendre l'organisation de ces structures en arbre de Noël : le filament axial est détruit par la désoxyribonucléase (DNase) mais son aspect n'est modifié ni par les protéases, ni par la ribonucléase (RNase). Le résultat est inverse si l'on considère les ramifications latérales : elles sont détruites par un mélange de RNase et de protéases mais sont insensibles à la DNase. On en conclut donc que ces arbres de Noël correspondent à des figures de transcription.

HYBRIDATION

Comme nous l'avons vu (1re partie, chap. VI), un fragment d'ADN bicaténaire peut être dénaturé par simple élévation de la température (90-110 °C) ou variation importante du pH. La rupture des liaisons faibles (liaisons H), qui maintiennent associés les deux brins, provoque leur séparation mais les liaisons covalentes (liaisons ester), qui associent les nucléotides, demeurent intactes ; la molécule devient monocaténaire. C'est une situation instable et, lorsque la température est lentement abaissée ou lorsque le pH redevient neutre, les deux polynucléotides se réassocient car les liaisons H se reconstituent entre les bases complémentaires : c'est la *renaturation* ; elle est fondée sur *la complémentarité des séquences.*

Si plusieurs fragments d'ADN obtenus à l'aide d'endonucléases de restriction sont dénaturés ensemble, le retour à des conditions normales de température ou de pH permet la réassociation de brins monocaténaires possédant des séquences complémentaires, mais ceux-ci ne sont pas obligatoirement ceux qui constituaient la molécule originelle : on parle d'*hybridation.*

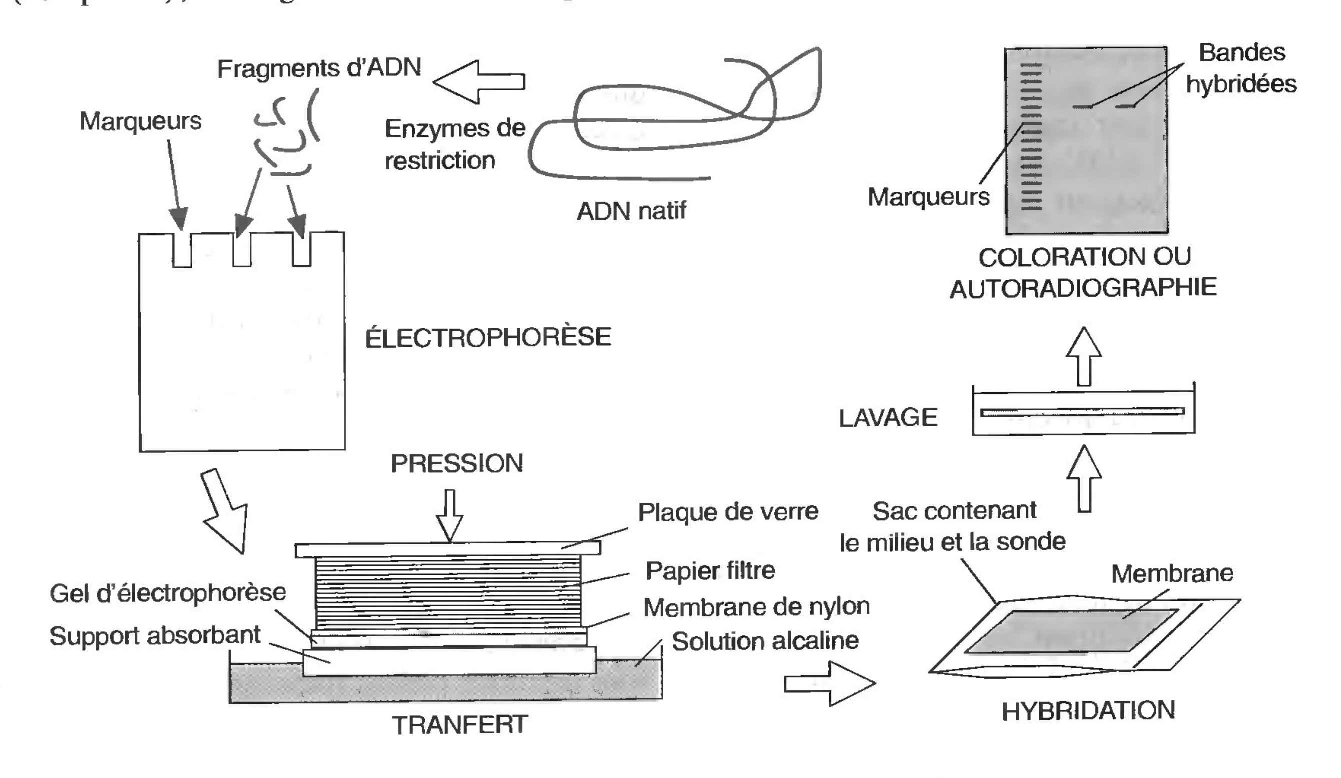
Une hybridation peut être obtenue entre molécules différentes, l'essentiel étant que les séquences de bases soient complémentaires. On peut ainsi avoir des hybrides ADN/ADN, ARN/ARN ou ADN/ARN. La molécule hybride est d'autant plus stable que la séquence de nucléotides complémentaires est longue ; en fait, ***l'hybridation ne peut se produire, et être maintenue, qu'entre polynucléotides codant la même information.***

Une hybridation peut être effectuée entre un fragment d'ADN extrait d'un tissu puis dénaturé et un oligonucléotide monocaténaire (1 000 à 2 000 nucléotides) obtenu par synthèse chimique ou par fragmentation d'un acide nucléique naturel de séquence connue ; cet oligonucléotide est ***une sonde*** qui peut être rendue identifiable par addition de colorants fluorescents ou d'éléments radioactifs. Cette sonde, en s'hybridant avec une molécule complémentaire, permet alors de *détecter une séquence nucléotidique spécifique dans un mélange hétérogène d'ADN dénaturé et/ou d'ARN.*

Deux méthodes faisant appel à l'hybridation sont couramment utilisées.

Le Southern blot

Cette méthode doit son nom au chercheur américain, E.M. SOUTHERN, qui l'a mise au point en 1975. L'ADN à étudier est d'abord coupé en fragments de taille variable par des enzymes de restriction (voir p. 176) ; ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose.



Après cette séparation, on dénature d'abord l'ADN par une solution alcaline (soude) puis on recouvre le gel par une membrane en nylon; l'ensemble est disposé sur un support poreux imbibé par une solution alcaline. Cette solution est aspirée par plusieurs couches de papier très absorbant recouvrant la membrane de nylon (d'où le nom de la méthode, *to blot* signifiant absorber avec un buvard). L'ensemble est mis sous pression. En traversant le gel, la solution alcaline entraîne les polynucléotides monocaténaires vers la membrane en nylon à laquelle ils adhèrent fortement: il y a ***transfert***.

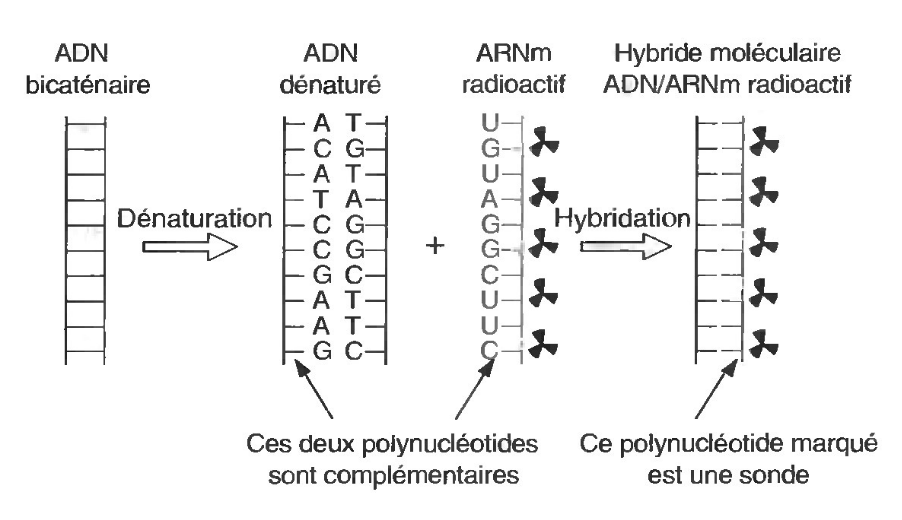
La membrane est récupérée et placée dans un tube en verre, ou un sac en plastique, en conditions renaturantes avec la sonde. Après une période plus ou moins longue la sonde est retirée du tube et la membrane soigneusement lavée. *Seules les molécules de sonde hybridées à l'ADN continuent à adhérer au support.* On peut alors localiser la sonde par une coloration ou par autoradiographie. La sonde situe dans le gel la position occupée par la séquence d'ADN (gène) recherchée.

Cette méthode extrêmement précise permet d'identifier un gène parmi les millions de nucléotides qui constituent le génome d'un organisme. Elle est très utilisée dans les laboratoires et a de nombreuses applications médicales; elle autorise, par exemple, le diagnostic très précoce des maladies génétiques; sa sensibilité permet en effet de distinguer un gène muté de son allèle normal à partir du moment où l'on dispose d'une sonde appropriée.

On peut analyser par une méthode comparable les ARN messagers isolés d'un tissu. Étant relativement courts, ils sont directement séparés par électrophorèse, transférés sur une membrane et hybridés avec une sonde, généralement un ADN monocaténaire. Cette technique a été baptisée de manière humoristique le Northern blot.

Hybridation *in situ*

L'hybridation d'une sonde, marquée par des colorants fluorescents ou des atomes radioactifs, avec le polynucléotide complémentaire peut être réalisée sur coupe, c'est-à-dire lorsque les séquences recherchées sont encore en place dans la cellule. Les sections de tissu sont, dans un premier temps, traitées par une solution à pH élevé qui dénature l'ADN, séparant les deux brins. Dans un second temps, les préparations sont recouvertes par une solution contenant la sonde (ADN ou ARN), puis soigneusement lavées. Les seules molécules de sonde qui restent adhérentes à la coupe histologique sont celles qui ont été hybridées. On a ainsi la possibilité de localiser, par la coloration développée ou après autoradiographie, un gène dans un chromosome ou un ARN dans une cellule. Cette méthode permet en outre, en comparant la distribution des ARNm dans les cellules, de suivre l'évolution de l'expression du génome au cours de la différenciation des organes ou des organismes.



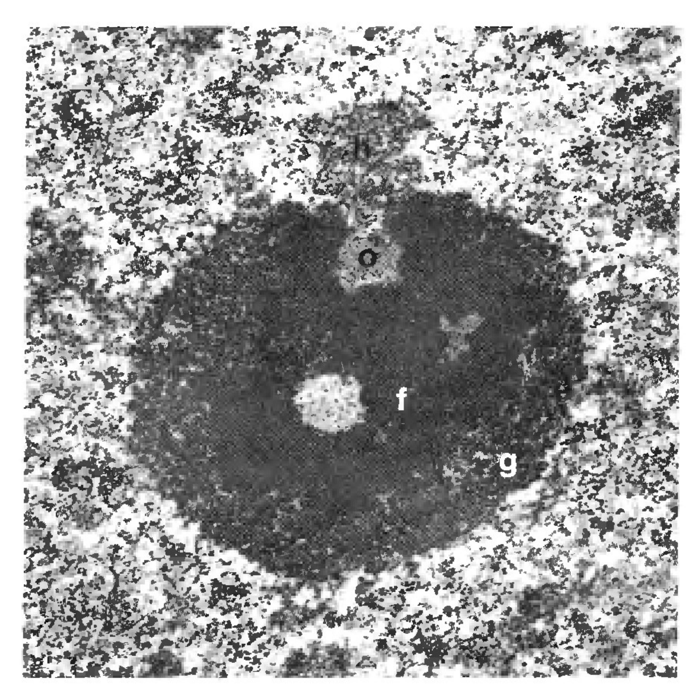


Fig. III-16 : Organisation du nucléole dans une cellule mère du pollen chez une plante supérieure, la jacinthe.

G. x 10 000. f, zone fibrillaire ; g, zone granulaire ; h, hétérochromatine ; o, organisateur nucléolaire. *(Reproduit de E.G. JORDAN et B.T. LUCK. The nucleolus organizer and the synaptonemal complex in* Endymion non-scriptus *(L.). J Cell Sci 1976 ; 22 : 75-86.)*

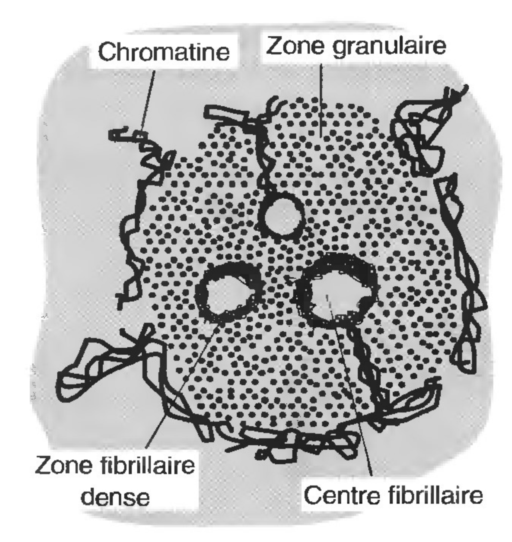


Fig. III-17 : Organisation schématique d'un nucléole.

Une unité de transcription est lue par plusieurs ARN polymérases, une centaine environ, progressant du site d'initiation au site de terminaison. L'ARN s'allonge progressivement au cours de cette progression, son extrémité 5' étant la plus éloignée de l'axe constitué par la molécule d'ADN *(fig. III-20)*.

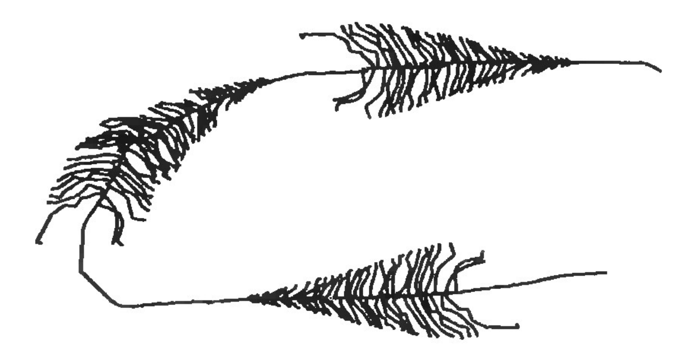


Fig. III-18 : Représentation schématique de la disposition des complexes de transcription obtenus après étalement moléculaire de la zone fibrillaire d'un nucléole d'Amphibien.

Plusieurs points méritent d'être soulignés :

1) La taille des ARN croissant régulièrement du site d'initiation au site de terminaison, on doit conclure qu'un seul brin de la molécule d'ADN est lu.

2) Les différentes unités de transcription sont disposées à la suite les unes des autres mais sont séparées par une portion d'ADN qui ne fait pas partie de cette unité, c'est l'ADN intercalaire ou espaceur.

3) Toutes les unités de transcription lisent le même brin d'ADN puisque tous les « arbres de Noël » présentent la même orientation*.

4) La destruction totale des ramifications latérales n'étant possible que dans la mesure où protéases et ribonucléases sont associées, on en déduit que les protéines se lient à l'ARN dès sa formation.

5) Il y a plusieurs molécules d'ARN qui entrent dans la constitution du ribosome mais il n'y a qu'un seul type de molécules qui est transcrit. Il s'agit d'*un transcrit primaire* ; il y a nécessairement ***un métabolisme post-transcriptionnel***.

Le nombre d'unités de transcription (le nombre de copies du gène) est particulièrement élevé chez le xénope, environ 600 ; bien que moins élevé chez les autres espèces (envi-

* C'est au moment de l'étalement des complexes sur un support que les brins d'ARN transcrits se répartissent de part et d'autre du nucléofilament, donnant l'impression que les deux brins d'ADN sont transcrits.

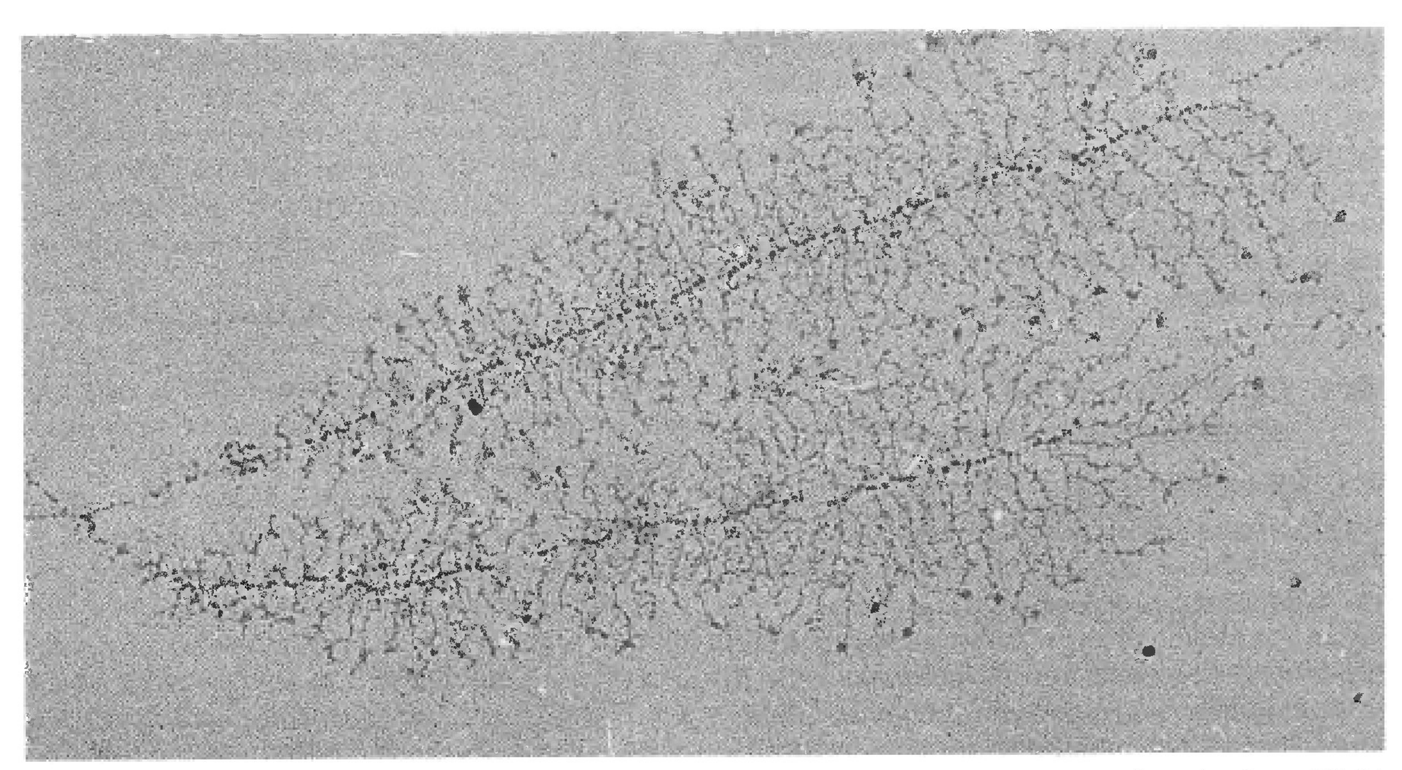


Fig. III-19 : Figures en arbre de Noël adoptées au moment de l'étalement par les transcrits primaires d'ARN ribosomaux obtenus à partir d'ovocyte d'Amphibien.
G. x 48 000.
(Reproduit de O.L. MILLER. The visualization of genes in action. Scientific American 1973 ; 228 : 34-42.)

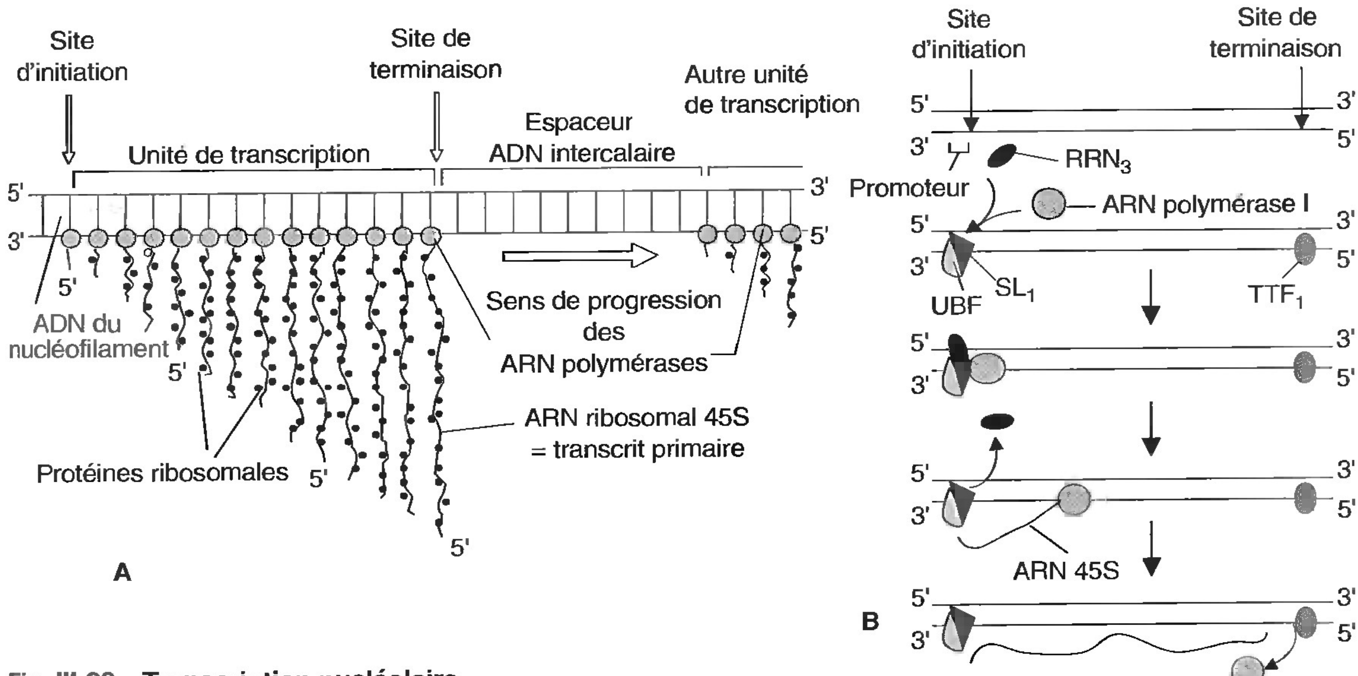


Fig. III-20 : Transcription nucléolaire.
A) Interprétation schématique d'une unité de transcription.
B) Le promoteur, en amont du site d'initiation, est reconnu par deux facteurs de transcription, UBF (pour Upstream BindingFactor) et SL1 (SL pour Selectivity Factor). L'installation de ces deux facteurs permet la fixation d'un troisième au site d'initiation (RRN3) ; c'est ce dernier qui recrute l'ARN polymérase I. Lorsque la transcription commence, RRN3 est libéré. À l'extrémité de l'unité de transcription, un facteur de terminaison, TTF1, permet la séparation de l'ARN polymérase et de l'ARN 45S.
Les nucléosomes n'ont pas été figurés sur ce schéma où le nucléofilament est limité à la molécule d'ADN.

ron 250 chez l'homme), il est toujours fort important*. Il ne faut pas oublier en effet qu'une cellule qui vient de se diviser reçoit la moitié des ribosomes de la cellule mère. Avant qu'elle-même puisse à nouveau entrer en mitose, elle doit reconstituer son stock de ribosomes, c'est-à-dire en synthétiser entre 5 et 10 millions.

B. Le métabolisme post-transcriptionnel

L'ARN préribosomal transcrit subit un métabolisme post-transcriptionnel dont l'analyse peut être effectuée en suivant le devenir de molécules marquées.

De l'uridine tritiée est fournie à des cellules en culture. Les cellules sont fixées après 5, 20 et 60 minutes en présence du précurseur radioactif. Les ARN nucléolaires sont alors extraits, séparés par centrifugation en fonction de leur densité *(fig. III-21)*.

Après 5 minutes de culture en présence du précurseur, on constate que des ARN dont les coefficients de sédimentation sont extrêmement variés, compris entre 0 et 50S, sont marqués. Ceci tient au fait que tous les ARN qui possèdent quelques nucléotides radioactifs sont identifiés. Ainsi toutes les molécules en cours de synthèse, qu'elles soient au début ou à la fin de leur édification, seront détectées puisque toutes auront eu la possibilité de fixer quelques nucléotides marqués; la répartition de la radioactivité est donc très étendue.

Après 20 minutes de culture, on retrouve cette répartition très étendue correspondant aux ARN en cours d'élaboration, mais il est apparu un pic à 45S qui correspond à une molécule dont la construction est terminée, qui s'est accumulée en quantité plus importante dans le nucléole.

Après 60 minutes, plusieurs pics de radioactivité émergent du fond correspondant aux ARN en cours d'élaboration; ce sont tous des ARN accumulés en plus grande quantité. On note la présence de l'ARN 45S, déjà observé après 20 minutes de pulse, et surtout celle des ARN ribosomaux 28S, 18S et 5,8S dont nous savons qu'ils participent à la constitution des ribosomes. Un autre ARN est également présent; son coefficient de sédimentation est situé à 32S; il n'existe pas dans les ribosomes et il n'apparaît pas après 20 minutes de culture.

La question qu'il convient de poser concerne donc la situation et le rôle des ARN qui ne se rencontrent pas dans le cytoplasme, c'est-à-dire les ARN 45S et 32S.

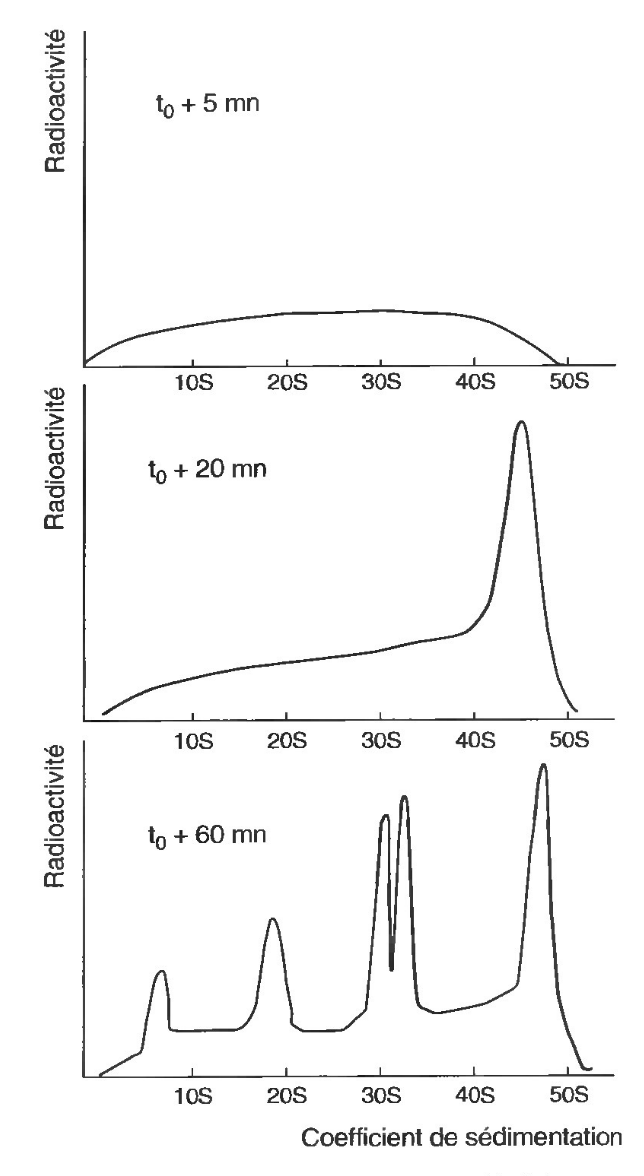


Fig. III-21 : Accumulation d'ARN nucléolaires pendant les 60 premières minutes qui suivent une incorporation de ^{3}H uridine.

* Chez les Eucaryotes, il y a plusieurs copies du gène codant pour les ARNr, le gène est dit **redondant**. Dans les ovocytes d'amphibien, il se produit en outre, au cours de l'ovogenèse, une réplication de ces gènes (les organisateurs nucléolaires); les copies se détachent et forment de petits nucléoles (plusieurs milliers), il y a **amplification** du génome.

Le problème peut être résolu en ajoutant au milieu de culture de l'actinomycine D après 20 minutes de culture. L'actinomycine se fixe sur l'ADN et ainsi interdit la progression des polymérases. Les transcriptions sont donc bloquées dès l'instant où cet antibiotique est présent.

L'analyse des ARN nucléolaires, une heure après le début de l'expérience *(fig. III-22)*, montre, d'une part, la disparition du fond de radioactivité correspondant aux ARN en cours de synthèse et, d'autre part, la présence des seuls ARN ribosomaux 5,8S, 18S, 28S.

Tous les ARN trouvés dans cette dernière expérience sont des ARN synthétisés pendant les 20 premières minutes, avant la mise en présence des cellules et de l'actinomycine. Or la première expérience montre que durant ces 20 premières minutes seul l'ARN 45S est produit et accumulé ; tous les autres ARN observés par la suite proviennent de cette molécule.

L'ARN 45S correspond donc au transcrit primaire. Celui-ci est ensuite clivé par des nucléases particulières, *à l'intérieur même du nucléole*, donnant naissance à des molécules intermédiaires dont fait partie l'ARN 32S observé après 60 minutes d'expérience *(fig. III-23)*.

Les séquences éliminées sont dégradées en nucléotides ; les protéines ribosomales synthétisées dans le cytoplasme, qui ont gagné le noyau, sont associées à l'ARN dès sa transcription et durant toute la maturation.

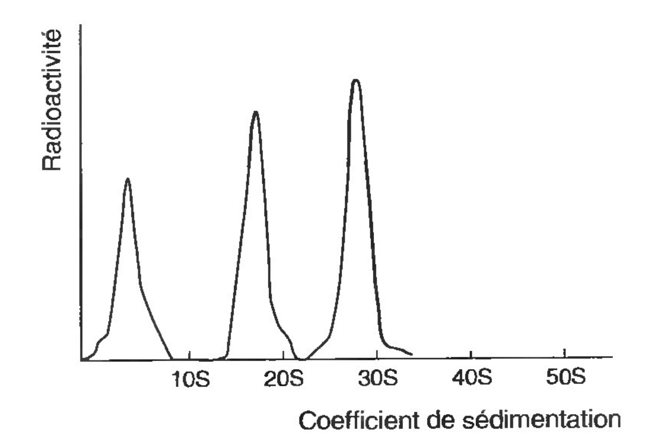


Fig. III-22 : Accumulation d'ARN nucléolaires lorsque les cellules ont été cultivées en présence de ^{3}H uridine et d'actinomycine.

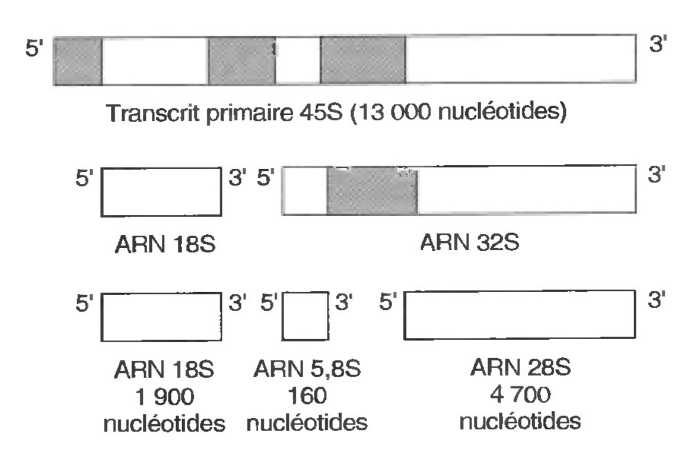


Fig. III-23 : Métabolisme post-transcriptionnel des ARN ribosomaux des Eucaryotes.

C. L'organisation du nucléole

Le nucléole est une structure dynamique comme l'atteste sa disparition périodique en fin de prophase mitotique et sa réapparition en télophase. C'est l'organite où sont transcrits les gènes ribosomaux, où les ARNr subissent leur maturation post-transcriptionnelle *(fig. III-24)* ; c'est également dans le nucléole que ces ARNr sont associés aux protéines pour former les préribosomes : l'ARN 18S s'associe à 33 protéines pour former la petite sous-unité du ribosome ; 50 autres protéines forment la grosse sous-unité avec les ARN 28S, 5,8S et la petite molécule d'ARN 5S, transcrite au niveau de la chromatine dispersée mais qui gagne le nucléole très rapidement après sa synthèse. Les protéines ribosomales sont synthétisées dans le cytosol et pénètrent dans le noyau car elles contiennent des séquences d'adressage (voir p. 187) ; elles gagnent ensuite le nucléole et s'associent aux ARNr pour constituer les différentes sous-unités ribosomales. Alors que chez les Bactéries les différents composants ribosomaux (ARN et protéines) peuvent s'associer *in vitro*, ceux des Eucaryotes ne le peuvent pas. L'assemblage des ribosomes serait réalisé par d'autres protéines jouant le rôle d'intermédiaire et associant, dans un ordre déterminé, les différents constituants. Ces préribosomes, petites et grosses sous-unités, quittent ensuite le nucléole ; ils ne sont cependant pas encore fonctionnels ; c'est seulement après avoir quitté le noyau qu'*ils subiront, dans le cyto-*

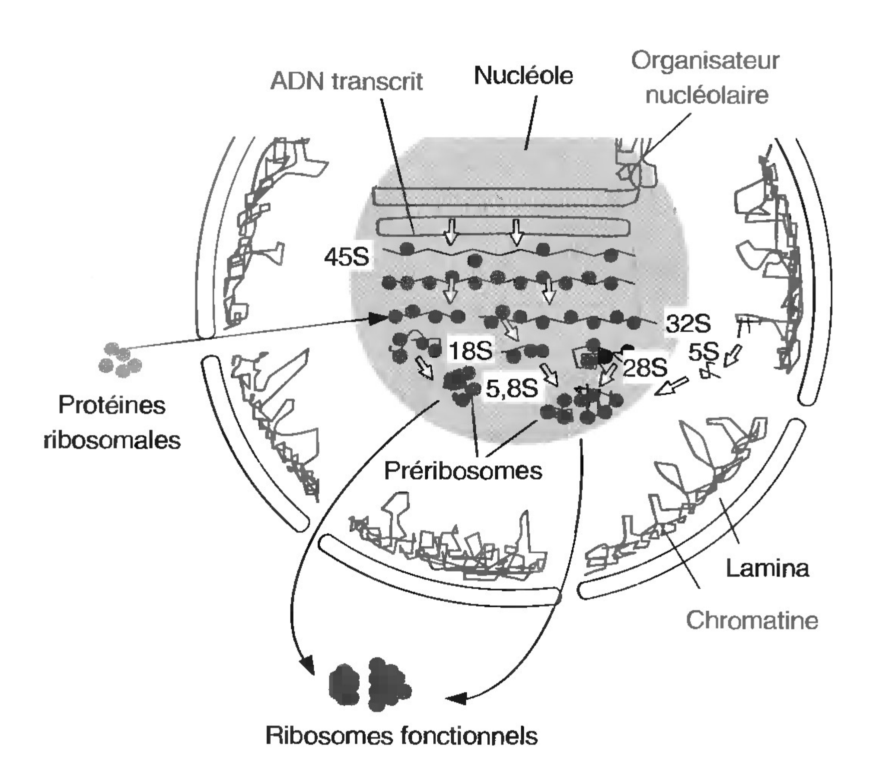


Fig. III-24 : Représentation schématique du nucléole et de l'évolution des ARNr chez les Eucaryotes.

plasme, une ultime maturation qui les rendra aptes à traduire les messagers.

Les gènes nucléolaires se répartissent sur plusieurs chromosomes (chez l'homme sur 10 chromosomes dans les cellules diploïdes), ce sont les *organisateurs nucléolaires*, car ce sont eux qui reconstituent le ou les nucléoles à la fin de chaque division cellulaire *(fig. III-25)*. Dans le noyau interphasique, une fine couche de chromatine plus ou moins continue entoure le nucléole pénétrant en certains points jusqu'aux centres fibrillaires ; c'est au niveau de ces derniers que se situent les zones de transition entre l'ADN transcrit et l'ADN inactif.

Si la zonation structurale est bien établie (centre fibrillaire – zone fibrillaire dense – zone granulaire), la zonation fonctionnelle l'est moins ; de nombreuses incertitudes subsistent en effet. On s'accorde pour admettre que *la synthèse des ribosomes est un processus vectoriel* qui débute aux limites du composant fibrillaire et se poursuit dans la zone granulaire qui l'entoure. Les méthodes immunocytochimiques (marquage par des anticorps fluorescents anti-ARN polymérase I et anti-topoisomérase) suggèrent que les synthèses sont localisées à la périphérie des centres fibrillaires, tandis que les hybridations *in situ* ADN-ARN semblent indiquer une accumulation *transitoire* des transcrits primaires dans les zones fibrillaires denses. Quant aux coupures post-transcriptionnelles, qui commencent dès la fin de la transcription, **elles sont contrôlées par de petits ARN**, les ARNsno (*sno*, pour *small nucleolar*) qui jouent le rôle de guide ; en s'appariant localement au précurseur, ils permettent la localisation précise du site de clivage. La coupure proprement dite fait appel à des protéines enzymatiques, nucléases et hélicases. Cette maturation des ARNr est déclenchée dans la zone fibrillaire et se poursuit dans la zone granulaire.

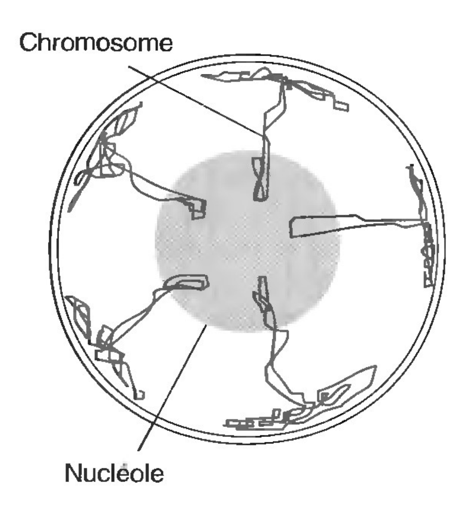


Fig. III-25 : Plusieurs chromosomes participent à la construction du nucléole.

Il ne faut pas cependant considérer le nucléole comme une simple accumulation de produits de la transcription; il y a une architecture nucléolaire fondée sur la présence d'une trame squelettique réalisée par des protéines comme *la fibrillarine* (qui structure les zones de transcription) ou *la nucléoline* (qui maintient les préribosomes dans la zone de maturation).

6.5. LA TRANSCRIPTION AU NIVEAU DE LA CHROMATINE DISPERSÉE

Comme nous l'avons vu, plusieurs ARN sont transcrits au niveau de la chromatine dispersée: l'ARN ribosomal 5S, les ARN de transfert (ARNt) et les ARN messagers (ARNm).

A. *Les modalités de la transcription*

L'ARN ribosomal 5S est transcrit par l'ARN polymérase III. C'est un ARN de petite taille, 120 nucléotides, qui est synthétisé à partir de gènes dont il existe plusieurs milliers de copies, réparties sur plusieurs chromosomes. Sur un chromosome, les différentes unités de transcription de cet ARN sont séparées par de grands intervalles non transcrits.

Dès qu'ils sont synthétisés, ces ARNr 5S migrent, comme nous l'avons vu, vers le nucléole où ils s'associent aux autres constituants des ribosomes.

Les ARN de transfert sont également transcrits par l'ARN polymérase III. Pour chaque ARN de transfert, il existe plusieurs copies du gène qui sont souvent groupées.

Le transcrit primaire de ces ARN, l'ARN prétransfert, contient en général une centaine de nucléotides. Il est sensiblement plus important que l'ARNt fonctionnel dont la longueur varie, selon l'espèce moléculaire, de 70 à 90 nucléotides; il existe donc pour ces molécules un métabolisme post-transcriptionnel.

Des ARN de petite taille, les snARN (sn pour *small nuclear*), sont également transcrits par l'ARN polymérase III. Nous envisagerons leur rôle ultérieurement (voir encadré p. 265).

La transcription des ARN messagers (ARNm) au niveau de la chromatine dispersée *(fig. III-26)* est beaucoup plus complexe. Ce

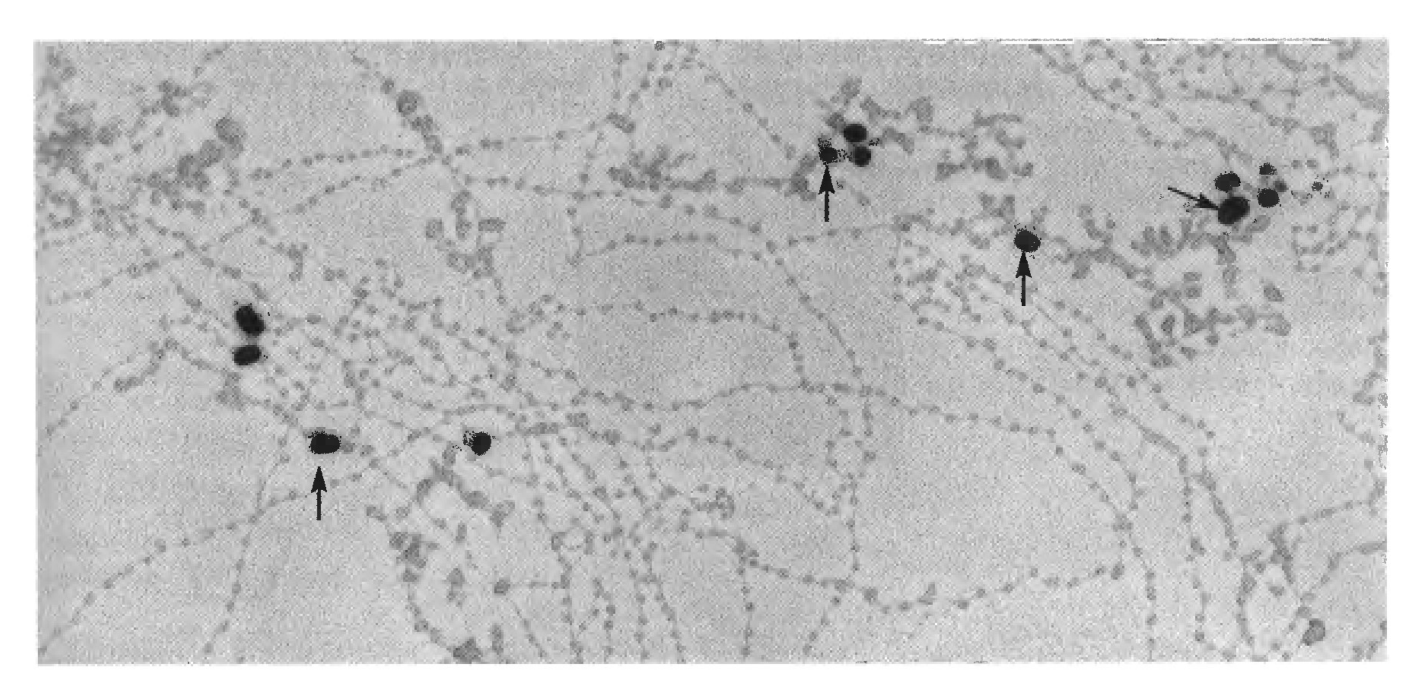


Fig. III-26 : Chromatine non nucléolaire étalée, en cours de transcription.
Après marquage de cellules de souris à l'uridine tritiée, l'autoradiographie révèle que la radioactivité (flèches) est associée aux ARN en cours de transcription; l'organisation nucléosomique de la fibre chromatinienne est bien visible. G. x 70 000.
(Reproduit de S. FAKAN et M. HUGUES. Fine structural ribonucleoprotein components of the cell nucleus visualized after spreading and high resolution autoradiography. Chromosoma 1989; 98: 242-249.)

sont des ARN très différents les uns des autres puisque ce sont eux qui sont traduits en protéines par les ribosomes, dans le cytoplasme; *il y a donc autant d'ARNm que de protéines dans la cellule*.

Tous sont produits par la même ARN polymérase, l'ARN polymérase II, mais la complexité qui caractérise leur élaboration tient aux séquences qui leur sont ajoutées au cours même de leur transcription *(fig. III-27)*.

Une coiffe (*cap* dans le langage anglo-saxon) est fixée à l'extrémité 5' de l'ARN en cours de formation; elle est constituée par *une guanine méthylée*, le noyau purique portant un groupement méthyle, CH_3. Un second groupe méthylé est fixé sur l'hydroxyle 2' du ribose du premier nucléotide. La liaison entre l'ARNm et la coiffe est assurée par l'intermédiaire des groupements phosphate portés par les carbones 5' des riboses des deux nucléotides: celui de la guanine méthylée ajoutée d'une part, celui du premier nucléotide transcrit d'autre part *(fig. III-28)*; une enzyme localisée dans le noyau, la guanylyltransférase, catalyse cette réaction. Le rôle de cette coiffe n'est pas encore très exactement compris; elle semble faciliter la liaison entre l'ARNm et le ribosome au moment où débute la traduction car elle est reconnue par un facteur de traduction. Elle peut aussi protéger l'ARNm contre une dégradation prématurée par les enzymes cytoplasmiques et faciliter leur transfert vers le cytoplasme.

Une queue polyadénylée, la queue poly (A), constituée par une succession d'*acides adényliques* en nombre variable, compris entre 20 et 200, est fixée à l'extrémité 3' par une enzyme spécifique, la poly (A) polymérase,

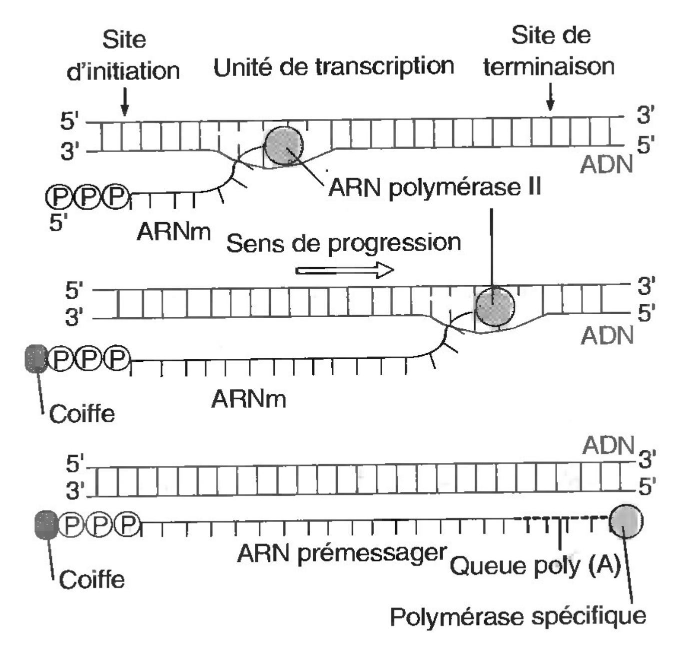


Fig. III-27: Synthèse d'un ARN messager d'Eucaryote: fixation de la coiffe et de la queue poly (A).

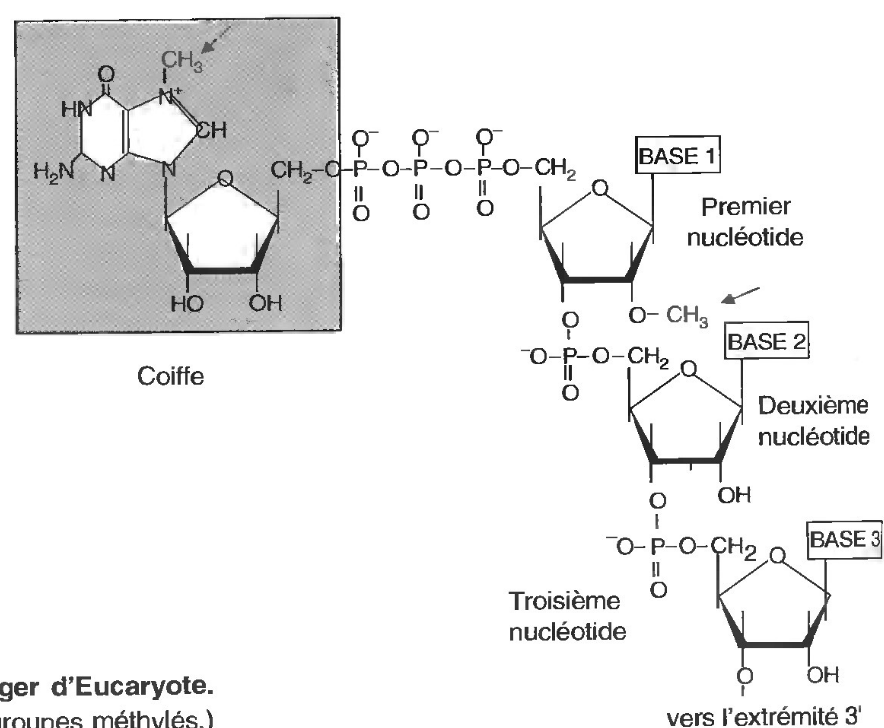


Fig. III-28: Coiffe d'un ARN messager d'Eucaryote.
(Les flèches indiquent la position des groupes méthylés.)

une fois la transcription achevée (fig. III-27). **Cette queue poly (A) est caractéristique des ARN messagers**; elle permet de les identifier et de les séparer dans une population regroupant tous les ARN cellulaires (ARNr, ARNt, ARNm). Cependant, elle n'existe pas chez tous les messagers; ceux des histones par exemple en sont dépourvus; or ces ARN sont dégradés rapidement dans le cytoplasme ce qui permet d'*attribuer à la queue poly (A) un rôle protecteur**. On a d'ailleurs pu constater que plus cette séquence additionnelle est importante, plus la vie de l'ARNm est longue; elle pourrait être dégradée progressivement au cours des traductions successives; lorsque les derniers acides adényliques sont éliminés, l'ARNm serait détruit. On ignore cependant comment la cellule contrôle l'importance de cette queue poly (A).

B. Les modifications post-transcriptionnelles

Ce sont les ARN messagers qui subissent les modifications post-transcriptionnelles les plus importantes. On peut les mettre en évidence relativement aisément.

Des cellules sont cultivées en présence d'uridine tritiée pendant 15 min; à l'instant t_0, elles sont transférées dans un milieu contenant de l'uridine froide (non radioactive). À t_0 + 5 min, t_0 + 30 min et t_0 + 60 min, les cellules sont prélevées et les noyaux séparés du cytoplasme.

On isole, *à partir du noyau et à partir du cytoplasme*, les ARN messagers que l'on peut identifier par leur queue poly (A). On détermine alors quels sont *les ARNm radioactifs* ***les plus longs***.

	Noyaux	Cytoplasme
t_0 + 5 min	8 000 nucléotides	Aucun ARNm radioactif
t_0 + 30 min	1 500 nucléotides	Aucun ARNm radioactif
t_0 + 60 min	1 200 nucléotides	1 200 nucléotides

* Chez les bactéries, les ARN messagers, dépourvus de queue poly(A), sont très rapidement détruits.

Tous les ARNm identifiés ont été synthétisés durant les 15 premières minutes de l'expérience, lorsque les cellules étaient en présence du précurseur. Si le nombre des nucléotides les constituant varie, c'est qu'**il y a un métabolisme post-transcriptionnel**. Il est intéressant de noter que celui-ci est **réalisé à l'intérieur du noyau**, avant le transfert dans le cytoplasme.

La question que l'on peut se poser concerne le point de la molécule où s'effectue la coupure car celle-ci est extrêmement importante; les données ci-dessus montrent que 85 % du transcrit primaire est éliminé.

Ce site de coupure peut être déterminé en comparant l'ADN ayant codé le transcrit primaire et l'ARNm cytoplasmique qui a subi la totalité du processus de maturation. Pour cette expérience, les oiseaux constituent un matériel remarquablement favorable. L'œuf de ces animaux (le « jaune » de l'œuf) est progressivement entouré, pendant son transit dans l'oviducte, par des réserves (le blanc de l'œuf) constituées presque exclusivement d'*un seul type de protéine*, l'ovalbumine.

Il y a donc dans les cellules sécrétrices de l'oviducte une quantité remarquablement importante d'un seul type de messager (environ 99 % des ARNm), celui correspondant à la synthèse de l'ovalbumine.

Parallèlement, on peut isoler l'ADN des noyaux cellulaires de l'oviducte de cet oiseau. On peut dénaturer cet ADN et procéder à une hybridation avec l'ARNm extrait précédemment. Ces hybrides ADN-ARN peuvent être étalés sur grille, soumis à un ombrage rotatif et observés en microscopie électronique *(fig. III-29)*.

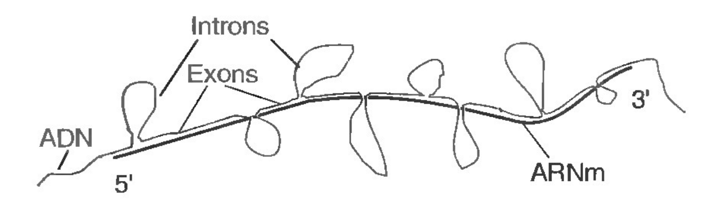


Fig. III-29 : Représentation schématique d'un hybride ARNm cytoplasmique-ADN observé en microscopie électronique après étalement moléculaire et ombrage rotatif.

ADN COMPLÉMENTAIRE (ADNc OU cDNA)

L'isolement direct de la fraction d'ADN codant pour une protéine, un gène, à partir du matériel génétique d'un organisme est particulièrement délicat. En effet un gène est souvent peu représenté dans l'ensemble du génome et ses limites sont difficiles à déterminer. Pour obtenir l'ADN codant pour une protéine, on a souvent recours à une méthode indirecte consistant à réaliser une copie de l'ARN messager.

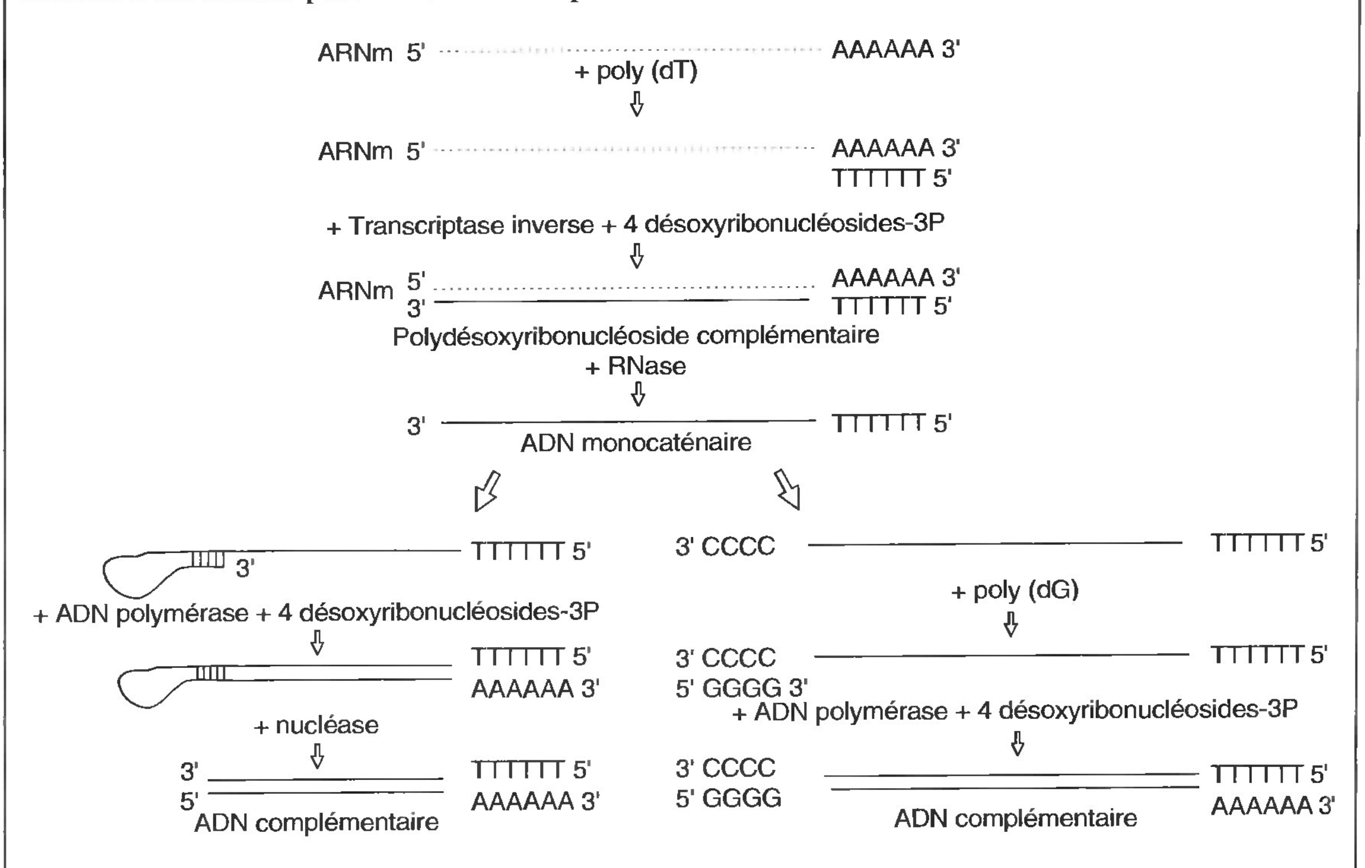
Le principe de la méthode est relativement simple : à partir de cellules dans lesquelles la protéine est produite, on isole les ARNm identifiables chez les Eucaryotes par leur queue poly (A). Ces ARN correspondent à la totalité des ARNm transcrits dans les cellules du tissu utilisé.

Ces ARNm (ou cet ARNm si on a pu identifier un ARNm précis) sont d'abord incubés en présence d'un nucléotide homogène constitué uniquement de désoxythymidine [poly (dT)], d'une enzyme d'origine virale, *la transcriptase inverse* (voir p. 18), qui est une ADN polymérase-ARN dépendante (c'est-à-dire une enzyme pouvant construire une molécule d'ADN en utilisant comme brin matrice une molécule d'ARN) et des quatre désoxyribonucléosides triphosphate.

Le poly (dT) s'hybride à la queue poly (A), dont il est complémentaire et ce court segment sert d'amorce pour la transcriptase inverse qui synthétise le brin d'ADN complémentaire de l'ARNm.

La molécule double brin ainsi obtenue est un hybride ARN-ADN ; pour obtenir un ADN bicaténaire il faut, dans un premier temps, détruire l'ARNm, soit chimiquement par la soude, soit enzymatiquement par une RNase ; l'ADN est alors monocaténaire et le second temps de la manipulation consiste à synthétiser un brin complémentaire. Cette synthèse est réalisée par une ADN polymérase en prenant l'ADN monocaténaire comme brin matrice.

Comme nous le verrons en étudiant la réplication (voir chap. IX), cette enzyme ne peut enchaîner les nucléotides que dans le sens 5' → 3' et seulement si elle dispose d'une amorce car elle ne peut pas positionner le premier nucléotide. L'ADN monocaténaire complémentaire de l'ARNm doit donc être modifié pour qu'à son extrémité 3' existe un fragment complémentaire qui servira d'amorce à l'ADN polymérase. Cette amorce peut être obtenue de plusieurs manières.



– *Par reploiement du brin d'ADN monocaténaire*, qui s'hybride avec la première séquence complémentaire qu'il trouve sur le brin; il y aura ainsi une extrémité 3' libre, constituant une amorce à partir de laquelle l'ADN polymérase peut enchaîner les désoxyribonucléotides. La boucle formée est ensuite détruite par une enzyme spécifique. L'inconvénient de la méthode est que le reploiement et la destruction de la boucle entraînent une perte d'information à une extrémité de la molécule; l'ARNm n'est pas intégralement copié.

– *En ajoutant une séquence poly (dC)* à l'extrémité 3' de l'ADN monocaténaire. Cette séquence peut être hybridée avec un polydésoxynucléotide homogène poly (dG) qui servira d'amorce pour l'ADN polymérase; celle-ci peut alors construire un brin complémentaire entier.

La molécule d'ADN bicaténaire obtenue est un ADN complémentaire ou ADNc ou cDNA.

L'ADNc d'une cellule ou d'un tissu peut être cloné et constituer une banque (voir p. 193). Il faut toutefois bien distinguer cet ADNc de l'ADN génomique, c'est-à-dire de celui qui peut être extrait du noyau des cellules : en effet, il est obtenu à partir des ARNm, donc de molécules qui ont subi un important métabolisme post-transcriptionnel (excision-épissage); ***il n'est donc pas la copie du gène.***

On constate alors que l'appariement des deux molécules est très partiel, seules les séquences conservées dans l'ARN cytoplasmique ayant pu s'associer à l'ADN; celui-ci comporte donc de nombreuses portions non hybridées, formant des boucles, qui correspondent aux fragments du transcrit primaire qui ont été éliminés en cours de maturation. On constate que les séquences éliminées ne sont pas regroupées à une extrémité de la molécule, mais au contraire plus ou moins régulièrement réparties. Seules certaines portions du gène sont donc effectivement utilisées pour former la molécule d'ARNm cytoplasmique; *le gène est dit morcelé*, ou *gène mosaïque*; la plupart des ARNm d'Eucaryotes sont de ce type. Les parties du gène qui sont utilisées pour construire l'ARNm exporté constituent les ***exons***; les séquences intermédiaires, dont le produit sera éliminé, sont les ***introns*** *(fig. III-30)*. Un gène morcelé est donc constitué par une succession plus ou moins importante d'introns et d'exons. Dans le cas de l'ovalbumine par exemple, le gène est constitué par 7 exons et 6 introns; les 6 introns représentent 85 % du transcrit primaire et la somme des exons 750 nucléotides. Il s'agit d'un métabolisme post-transcriptionnel beaucoup plus complexe que celui mis en œuvre pour former les ARNr et les ARNt puisqu'il nécessite, après la coupure, une réassociation de certains brins séparés.

Le nombre des exons et des introns peut être beaucoup plus élevé, 53 exons et 52 introns pour le gène du collagène des oiseaux, par exemple.

Les mécanismes mis en jeu pour réaliser la coupure du transcrit primaire, *l'excision*, et l'assemblage des exons, *l'épissage*, doivent être extrêmement précis, au nucléotide près; **en effet, un décalage d'un seul nucléotide modifie la nature du triplet qui suit la coupure, or ces triplets constituent le fondement du code génétique**; au moment de la traduction il y aurait donc une lecture différente du messager et la protéine synthétisée serait tout autre que celle programmée.

L'excision et l'épissage peuvent être réalisés par l'ARN lui-même *(fig. III-31)*; cet autoépissage est possible, car l'ARN possède des propriétés autocatalytiques. Ce mécanisme, observé au cours du métabolisme post-trans-

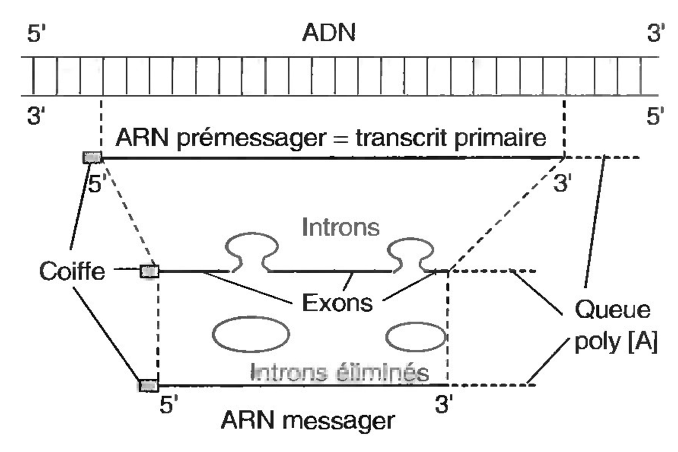


Fig. III-30 : Excision-épissage d'un ARNm d'Eucaryote.

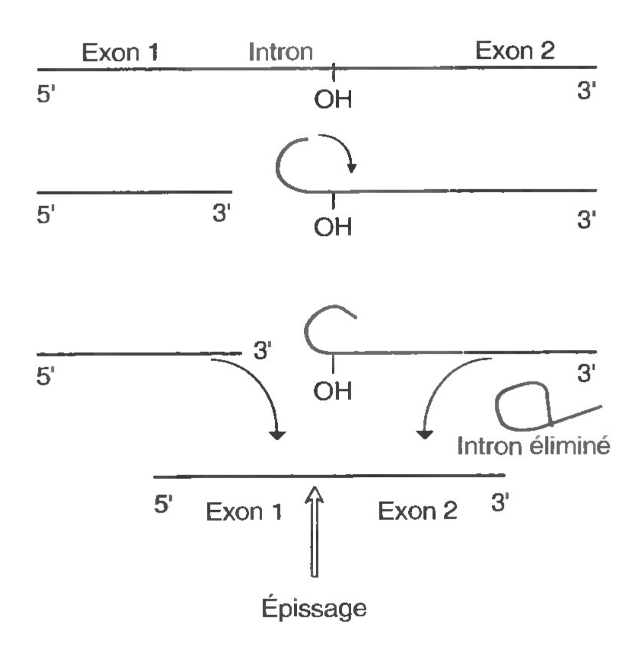


Fig. III-31 : Activité autocatalytique de l'ARN et excision-épissage.

criptionnel de certains ARN chez quelques Protozoaires, est certainement primitif.

Chez les Eucaryotes, en effet, excision et épissage sont effectués dans des complexes macromoléculaires, les snRNP (de l'anglais, *small* ***nuclear RiboNucleoProteins***) ou snurp (de l'anglais, *small* ***nuclear ribonucleo****proteins*), contenant plusieurs protéines et plusieurs petites molécules de snARN, ou ARNsn. On connaît au moins 7 snARN, identifiés par la lettre U et un chiffre (U1 à U7) mais tous ne sont pas impliqués dans l'excision-épissage ; seuls interviennent U1, U2, U4, U5 et U6 ; chacun de ces ARN est associé à 6 à 10 protéines pour constituer les snurp. Ces snurp sont liés au pré-messager avec lequel ils constituent de gros complexes de 10 nm de diamètre environ, les *splicéosomes* (de l'anglais *to splice*, épisser). Ces complexes ne traversent pas les pores nucléaires, *excision et épissages sont donc nécessairement intranucléaires.*

La coupure a toujours lieu en un point identifiable par une séquence particulière GU (Guanine-Uridine) qui correspond au début de l'intron *(fig. III-32-A)*. Après cette coupure, l'extrémité 5' de l'intron se replie et vient se lier de manière covalente (liaison ester) au groupement OH porté en 2' par un nucléotide adénylique, situé à une distance de 25 nucléotides environ, au niveau d'une séquence particulière, *le site de branchement (fig. III-32-B à F)*. L'établissement de cette liaison conduit ainsi à la formation d'une boucle. Ensuite, l'autre extrémité est coupée après la séquence terminale AG et l'intron libéré *(fig. III-32-G et H)*, cette partie de la molécule adoptant alors la forme d'un lasso. Les extrémités libres des deux exons qui encadraient cet intron sont alors associées par une liaison phosphodiester, c'est l'épissage proprement dit.

La découpe du pré-messager est précise car les petites molécules de snARN (de 50 à 200 nucléotides) reconnaissent le début et la fin d'intron, ainsi que le site de branchement par *complémentarité des séquences de bases.* Ce sont ces petits ARN qui sont les agents catalyseurs, les protéines n'interviennent que pour maintenir la conformation de l'ensemble et pour présenter les différentes molécules d'ARN de manière à ce que les réactions puissent se réaliser.

Le processus, qui est consommateur d'énergie et nécessite la présence d'ATP, est en lui-même fort compliqué ; il met en œuvre les différents snARN de *manière séquentielle* et la *figure III-32*, sur laquelle le principe seulement est présenté, rend compte de la complexité du mécanisme mis en œuvre.

Ce processus excision-épissage, apparemment très dispendieux, est peut-être la trace d'un mécanisme évolutif déjà évoqué. Nous avons vu, en étudiant les protéines, que celles-ci étaient souvent constituées par l'association de domaines fonctionnels et que des domaines semblables se retrouvaient souvent dans des molécules différentes. Il est possible que les exons correspondent à ces domaines, le gène actuel résultant de la juxtaposition de plusieurs gènes ancestraux dont seules certaines portions auraient été conservées. Ces recombinaisons génétiques auraient permis la création rapide de nouvelles protéines ; elles représenteraient donc un processus évolutif extrêmement important.

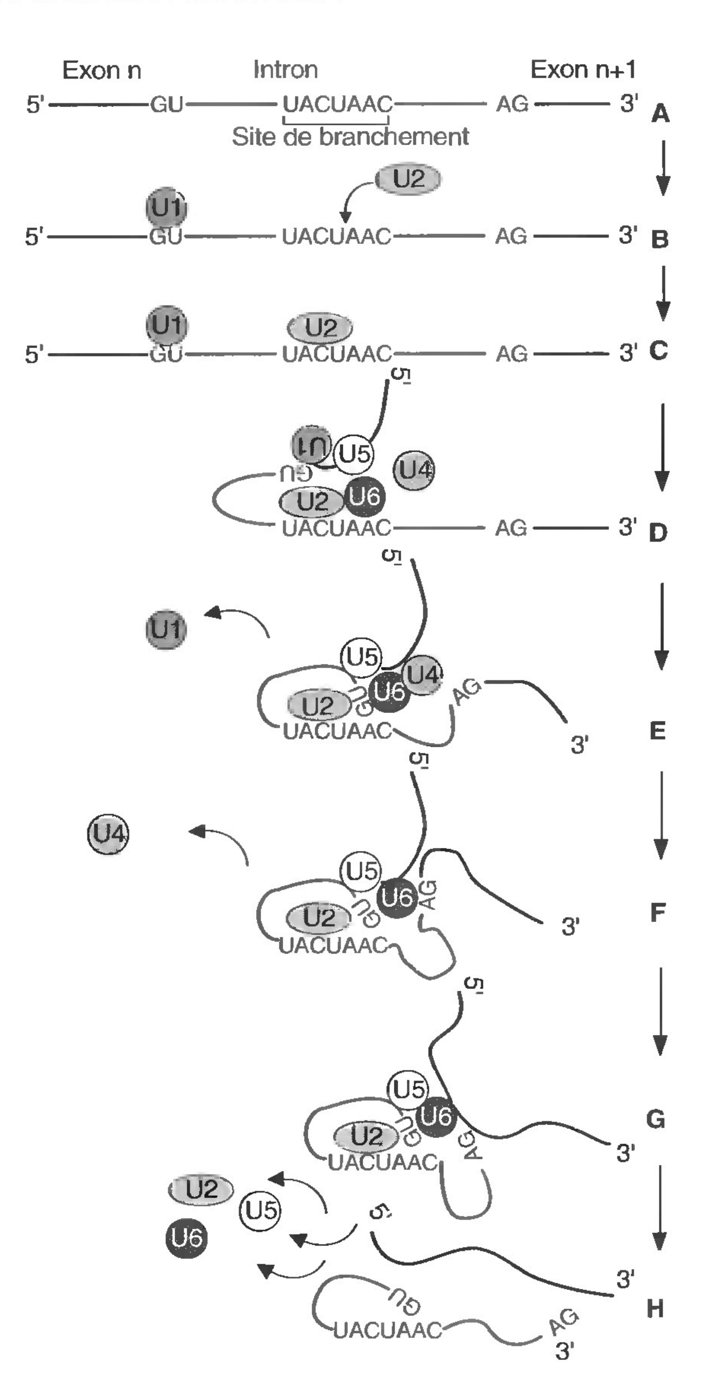


Fig. III-32 : Excision-épissage d'un intron dans un complexe macromoléculaire, le splicéosome.

A) L'intron, figuré en rouge, est délimité par deux séquences particulières : à son extrémité 5' une séquence GU, à son extrémité 3' une séquence AG. Une séquence consensus, située à quelque distance en arrière de GU, précise le site de branchement qui permettra la formation de la boucle.

B) Une première petite molécule d'ARN (snARN), U1, identifie la séquence GU à laquelle elle se lie.

C) Une seconde, U2, vient ensuite s'associer au site de branchement.

D) À ces deux premiers snARN viennent s'en ajouter d'autres (U4, U5, U6) ainsi que des protéines (non figurées sur le schéma) constituant un complexe qui, en modifiant la conformation du pré-messager, rapproche GU d'une adénine du site de branchement.

E) U1 est éliminé, ce qui permet le déplacement de U5 de l'exon n sur l'intron ; ceci permet le rapprochement de U6 et de la séquence terminale AG de l'intron.

F) U4 est à son tour éliminé du complexe et l'ensemble U5/U6 catalyse l'estérification entre le nucléotide G de la séquence d'entrée de l'intron et un nucléotide A du site de branchement, libérant ainsi l'extrémité 3' de l'exon n.

G) Le complexe U2/U5/U6 toujours lié à l'intron et aux exons n et n + 1 coupe la molécule à l'extrémité 3' de l'intron et réalise la liaison entre les deux exons.

H) Le complexe, en se dissociant, libère le nouvel exon (n et n + 1 associés) et l'intron ; ce dernier, sous forme d'une boucle munie d'une queue (en forme de lasso), est éliminé.

CONCLUSION

La transcription de l'information génétique constitue donc, au niveau moléculaire, un mécanisme extrêmement précis. Elle peut paraître une complication du système biologique puisqu'elle impose un intermédiaire entre l'ADN et les protéines ; il est d'ailleurs probable que ce mécanisme ne fut pas le premier mis en place ; on a tendance, en effet, à considérer que l'information fut d'abord stockée sur une molécule simple brin comme l'ARN. Il faut cependant noter que le système intercalant un intermédiaire entre information

et protéines présente, d'un point de vue évolutif, une amélioration certaine. La structure bicaténaire apporte en effet une stabilité beaucoup plus grande et le mécanisme de la transcription permet la mise en œuvre des processus de régulation complexes au niveau du promoteur.

Chez les Eucaryotes, la complexité est encore plus grande puisqu'il n'y a plus la colinéarité gène-protéine observée chez les Procaryotes : les conséquences des remaniements post-transcriptionnels des ARNm sont certainement, du point de vue fonctionnel, considérables ; il est hors de propos d'en discuter ici toute l'importance. Il convient cependant de remarquer qu'une sélection différente des exons sur un gène permet d'obtenir, à partir d'un même transcrit primaire, des ARNm, et donc des protéines, tout à fait différents (*fig. III-33*) ; c'est le cas des lamines notamment (p. 183). Il faut simplement noter que ces remaniements sont rendus possibles par l'existence d'une enveloppe nucléaire, dont les pores contrôlent les transits noyau-cytoplasme. On retrouve donc à ce niveau la notion de compartimentation et il est indiscutable que l'acquisition de cette compartimentation a constitué une étape évolutive considérable.

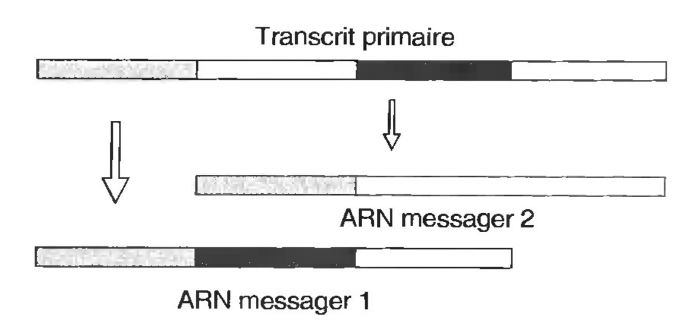


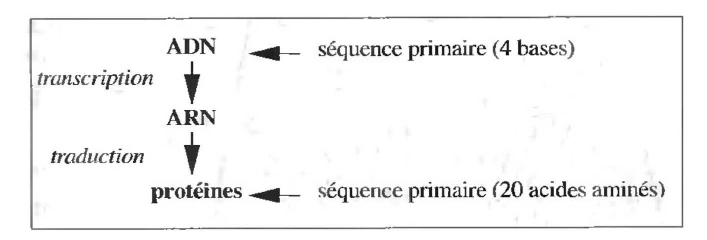
Fig. III-33 : **Épissage alternatif et sélection des exons.**

CHAPITRE IV

La traduction

Il a été vu dans les chapitres précédents que les protéines sont les constituants clefs de la machinerie cellulaire. Leur activité biologique est liée à leur organisation tridimensionnelle, elle-même déterminée par leur structure primaire, c'est-à-dire l'ordre linéaire d'enchaînement des acides aminés.

La question pour la cellule est donc de pouvoir assembler les acides aminés dans un ordre défini avec le minimum d'erreurs. Reprenons le **dogme central** établissant la relation entre l'ADN et les protéines (voir 2e partie, chap. III) :



Le but de ce chapitre sera donc :

– de comprendre comment l'**ARN est un intermédiaire** entre l'ADN, molécule porteuse d'information stockée dans chaque cellule, et les protéines, molécules à activité biologique spécifique, expression de cette information. On verra que les trois catégories de molécules d'ARN sont impliquées ;

– de décrypter le code dont dispose la cellule pour établir la correspondance entre la séquence de l'ARN (établie avec un système de 4 bases) et la séquence de la protéine (établie avec un système de 20 acides aminés) ; c'est le **code génétique** ;

– d'analyser les étapes de biosynthèse d'une protéine chez les Procaryotes et les Eucaryotes. C'est le mécanisme de **traduction**.

1. LA LOCALISATION DE LA TRADUCTION

Sur le plan purement morphologique, les observations au microscope électronique fournissent quelques indications sur les lieux de synthèse des protéines. En effet une relation peut être établie entre une forte activité de synthèse protéique et la présence dans la cellule de nombreux polysomes libres ou liés aux membranes du réticulum endoplasmique.

On peut distinguer deux types de cellules :

– les *cellules sécrétrices* (telles les cellules du pancréas exocrine, les plasmocytes...) où les polysomes sont liés aux membranes du réticulum formant un important RER (réticulum endoplasmique rugueux ; il est parfois appelé REG, réticulum endoplasmique granulaire) ;

– les *cellules non sécrétrices* ou n'ayant pas une forte activité sécrétrice (telles les réticulocytes) où l'on observe surtout des polysomes libres lorsque la cellule est en phase de synthèse active.

C'est surtout par des expériences d'**autoradiographie** qu'il est possible de visualiser les sites de synthèse des protéines. L'expérience suivante dont le protocole est classique (le principe de l'autoradiographie a été présenté dans les chapitres précédents, voir en particulier p. 161) en donne un exemple :

– une injection intra-veineuse de **leucine tritiée** (^{3}H leu) est faite à un cobaye pendant 3 minutes. Ceci constitue un *pulse*. La leucine est choisie comme acide aminé précurseur dans la mesure où elle est présente dans la plupart des protéines ;

– l'animal est sacrifié. Le pancréas est fixé chimiquement et inclus dans une résine. Le pancréas est choisi car ses cellules présentent une forte activité de synthèse ;

– des coupes fines et ultrafines sont traitées ensuite selon les techniques d'autoradiographie. Elles sont observées au microscope photonique et au microscope électronique.

Les résultats sont schématisés sur la *figure IV-1*. Les grains d'argent apparaissent localisés dans la région basale des cellules pancréatiques, l'observation au microscope électronique révélant que ces grains sont visibles plus précisément au niveau des nappes de réticulum endoplasmique granulaire.

L'interprétation des images permet de conclure que, dans ces cellules d'Eucaryote, la ***synthèse des protéines se fait dans les régions riches en ribosomes et en particulier au niveau de profils de RER, abondants dans la partie basale de la cellule.***

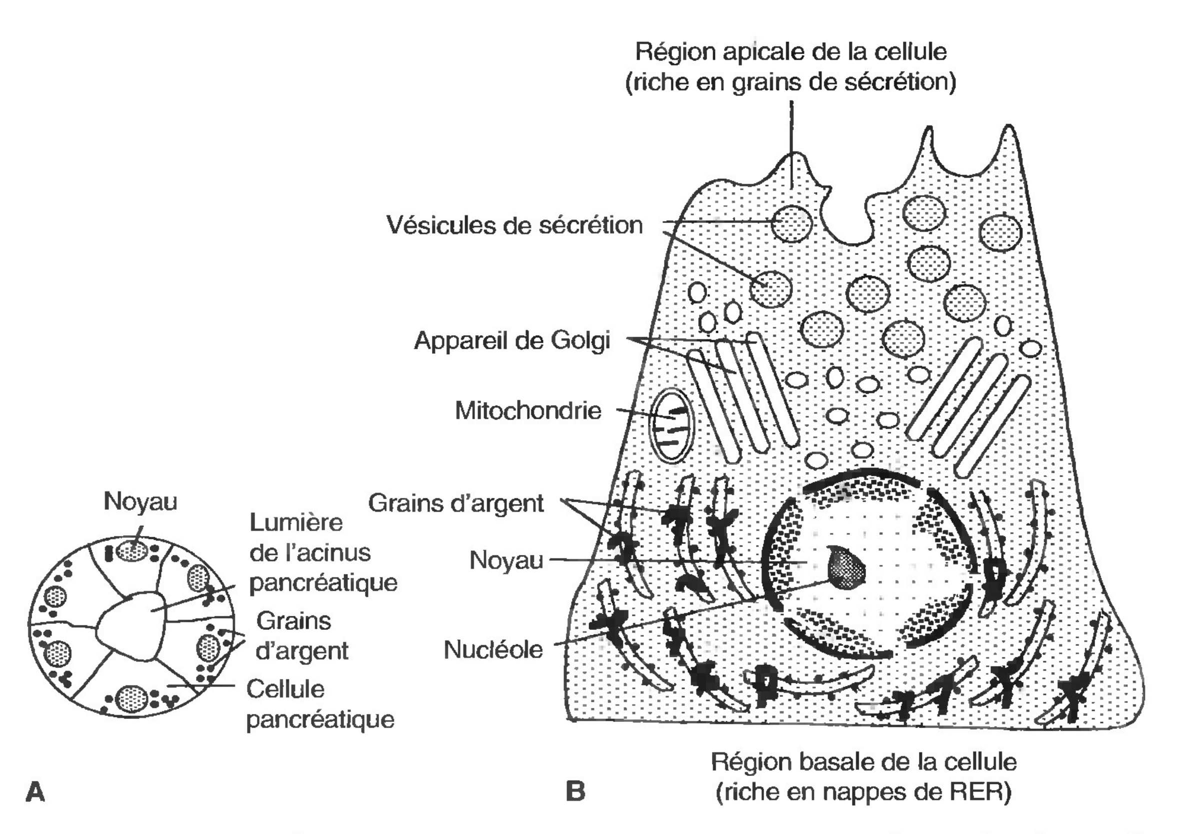


Fig. IV-1 : Résultats d'une expérience d'autoradiographie montrant une synthèse active de protéines dans des cellules d'un acinus pancréatique.
Incorporation de ^{3}H leucine (pulse de 3 minutes) puis autoradiographie de cellules fixées.
A) Au microscope photonique. Les grains d'argent sont visibles à la base des cellules pancréatiques.
B) Au microscope électronique. Les grains d'argent sont localisés au-dessus les profils de réticulum endoplasmique riches en ribosomes (RER).

2. L'IMPORTANCE DES ARN DANS LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Les expériences précédentes indiquent que la synthèse des protéines se fait sur les ribosomes que l'on peut donc considérer comme de minuscules « ateliers » de fabrication. La traduction est un mécanisme très important et très précis qui conduit, par exemple, à la formation de près d'un million de liaisons peptidiques par seconde dans une cellule de Mammifère en période d'activité normale. La rencontre, au sein des ribosomes, des partenaires moléculaires impliqués permet donc une efficacité bien plus grande que s'ils étaient libres dans la cellule.

Avant d'entrer dans le détail des mécanismes, il est important de préciser le rôle respectif des 3 types d'ARN dans cette synthèse :

– les **ARN messagers** (ARNm) portent l'information copiée à partir de l'ADN sous forme d'une séquence de bases ;

– les **ARN ribosomaux** (ARNr) s'associent avec de nombreuses protéines pour organiser une structure permettant l'interaction de toutes les molécules impliquées dans la synthèse protéique (ARNt, ARNm et facteurs protéiques). **C'est le ribosome** ; nous verrons que les ribosomes sont capables de coulisser le long de l'ARN messager où est encodée l'information ;

– les **ARN de transfert** (ARNt) sont les molécules clefs pour le code. Ce sont les molécules qui portent et ajoutent à l'extrémité en croissance d'une chaîne polypeptidique les acides aminés correspondant à la séquence de bases de l'ARNm.

2.1. L'ARN RIBOSOMAL ET LES RIBOSOMES

Décrits pour la première fois dans les années 1950 sous le nom de grains de Palade (du nom de Georges PALADE qui les a découverts), les ribosomes sont des particules de taille voisine de 20 nm. Ils sont constitués de deux sous-unités de tailles différentes, la petite et la grosse sous-unité. Pour pouvoir préciser les caractéristiques de ces sous-unités, il est nécessaire de rappeler les techniques qui permettent d'obtenir une fraction pure.

A. *Fractionnement et isolement des ribosomes*

Le but du fractionnement est d'obtenir un culot aussi enrichi que possible en ribosomes, dans lequel ces derniers conservent leur intégrité à des fins d'observation et d'analyse. La technique d'isolement comprend les étapes suivantes *(fig. IV-2)*.

• **Homogénéisation**

Les tissus sont broyés mécaniquement dans des conditions définies : milieu tamponné contenant des ions Mg^{2+} (nous verrons plus loin le rôle joué par cet ion dans l'association des sous-unités des ribosomes), basse température (de façon à inactiver les enzymes libérées par rupture des membranes). Souvent du saccharose est ajouté pour « protéger » les organites. On obtient ainsi un broyat cellulaire ou « homogénat ».

• **Centrifugation différentielle**

Cette étape qui fait intervenir des centrifugations successives à vitesses croissantes permet de séparer progressivement les organites cellulaires en fonction de leur taille. La dernière fraction obtenue est la fraction « microsomes ». C'est la fraction obtenue à partir du surnageant post-mitochondrial *(fig. IV-2, A)*.

• **Purification de la fraction microsomes sur gradient de densité**

La purification peut être réalisée sur un gradient de saccharose, c'est-à-dire dans un tube dans lequel la concentration en saccharose augmente progressivement du haut vers le bas. Les organites se répartissent dans ce gradient selon deux bandes :

– les **microsomes lisses,** c'est-à-dire les membranes du réticulum endoplasmique lisse (REL) et les membranes de l'appareil de Golgi ;

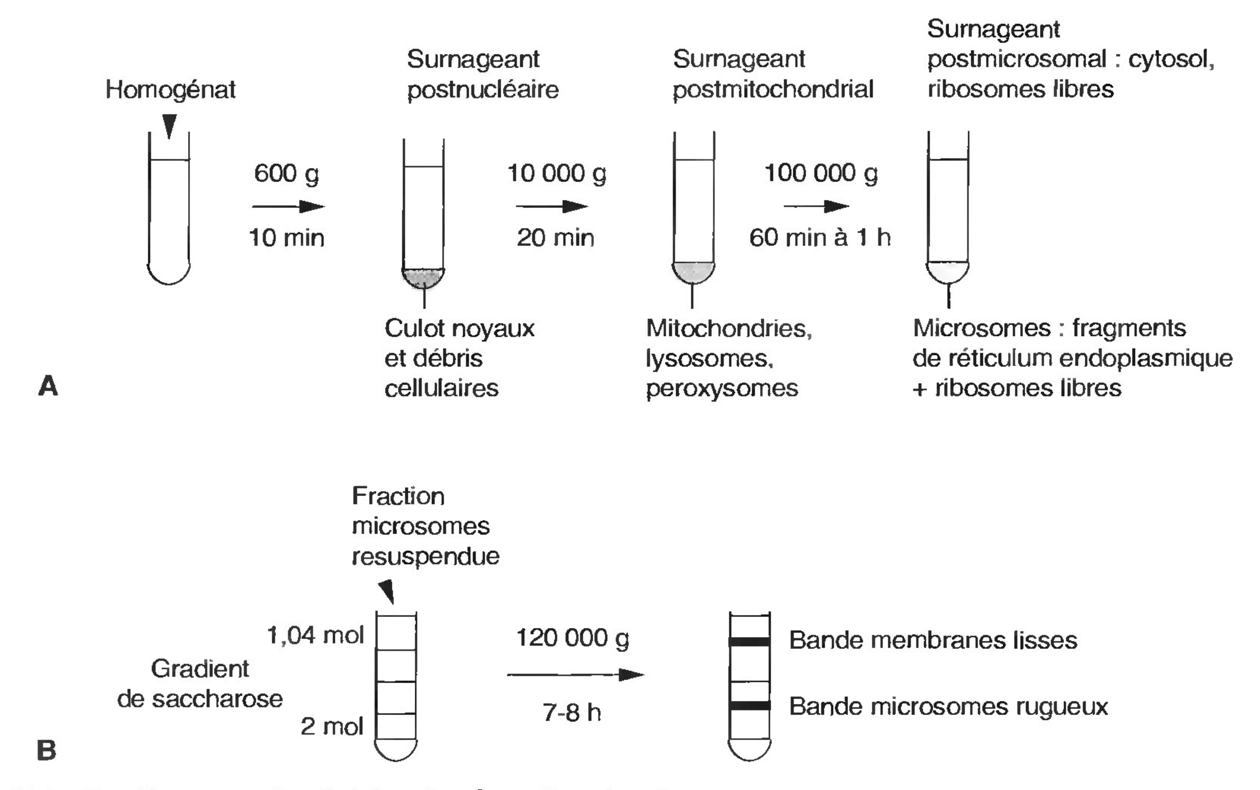


Fig. IV-2 : Fractionnement cellulaire et préparation de microsomes rugueux.
A) Etapes de centrifugation différentielle.
B) Etapes de centrifugation à l'équilibre sur gradient de densité.

– les **microsomes rugueux**, c'est-à-dire les membranes du réticulum endoplasmique rugueux (RER) *(fig. IV-2, B)*.

Les microsomes rugueux peuvent ensuite subir deux traitements successifs *(fig. IV-3)* :

– l'action d'un détergent doux (par exemple le désoxycholate de sodium) qui va permettre de séparer les ribosomes des membranes ;

– la récupération des ribosomes dans un milieu où la concentration en Mg^{2+} est plus faible que lors de l'homogénéisation, ce qui a pour effet de séparer les sous-unités des ribosomes. En effet, en système acellulaire, une trop forte concentration de Mg^{2+} conduit à l'association des deux sous-unités. Les sous-unités peuvent alors être récupérées par centrifugation et observées au microscope électronique.

B. Composition chimique des ribosomes

Les ribosomes des Procaryotes et des Eucaryotes sont différents par leur taille. Il est habituel de les appeler ribosome 70S et ribosome 80S, ce qui correspond à leur vitesse respective de sédimentation exprimée en unités Svedberg.

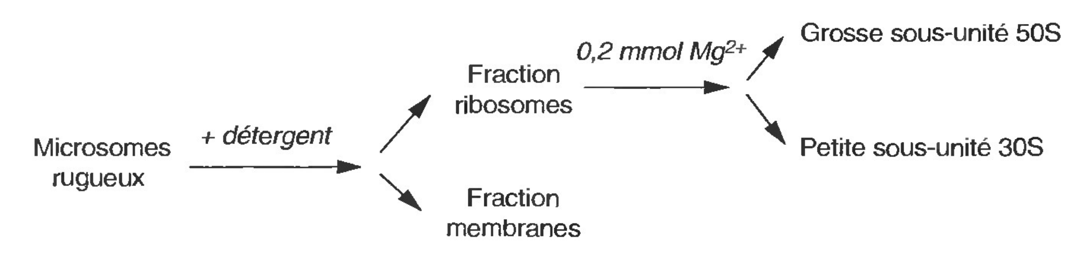


Fig. IV-3 : Récupération des sous-unités des ribosomes.

Tous les ribosomes sont constitués de deux sous-unités, elles-mêmes caractérisées par leur coefficient de sédimentation. Les sous-unités contiennent :

– un fort pourcentage d'eau, soit environ 70 % en données pondérales ;

– des protéines. *Leur nombre est important et défini.* Chez les Procaryotes les séquences des protéines ont été établies au cours des dernières années et il apparaît que, à part quelques exceptions, chaque protéine ne se trouve qu'en un seul exemplaire dans les sous-unités ;

– des molécules d'ARNr. Là encore leur nombre et leur coefficient de sédimentation sont très définis. Il existe 3 molécules d'ARNr dans les ribosomes des Procaryotes, 4 molécules dans les ribosomes des Eucaryotes. La séquence des ARNr commence maintenant à être connue. Des régions sont très conservées et organisent des structures bidimensionnelles à tiges et à boucles bien caractéristiques.

Le *tableau IV-1* résume les principales caractéristiques des ribosomes.

C. *Organisation moléculaire des ribosomes*

Les ribosomes constituent un assemblage moléculaire très complexe dans lequel il est difficile de connaître exactement la façon dont les molécules d'ARNr et les protéines sont assemblées. Deux types d'approche peuvent être proposés pour tenter de localiser les molécules constitutives.

- **Localisation des points d'affleurement de l'ARNr par action ménagée de la ribonucléase**

Les expériences permettant de localiser l'ARNr dans les ribosomes sont fondées sur les hypothèses suivantes : si l'on fait agir de façon douce de la RNase sur une population de ribosomes on s'attend à obtenir trois types possibles de résultats :

– tout l'ARN est digéré ce qui signifie qu'il est complètement localisé à l'extérieur du ribosome ;

TABLEAU IV-1
Quelques caractéristiques structurales des ribosomes de Procaryotes et d'Eucaryotes

	Molécules d'ARNr	Protéines	Sous-unité	Ribosome associé
Procaryotes	23S *2 900 bases*; 5S *120 bases*	L1 à L31 *total : 31*	grosse sous-unité 50S	**Ribosome procaryote 70S** *MM 2 500 kDa*
	16S *1 540 bases*	S1 à S21 *total : 21*	petite sous-unité 30S	
Eucaryotes	28S *4 700 bases*; 5,8S *160 bases*; 5S *120 bases*	L1 à L50 *total : 50 approx.*	grosse sous-unité 60S	**Ribosome eucaryote 80S** *MM 4 200 kDa*
	18S *1 900 bases*	S1 à S33 *total : 33 approx.*	petite sous-unité 40S	

– aucun ARN n'est digéré, ce qui signifie qu'il est complètement localisé à l'intérieur du ribosome et ainsi « protégé » de l'action de l'enzyme ;

– de petits fragments d'ARN sont récupérés, ce qui signifie que les molécules d'ARN « affleurent » en surface du ribosome en quelques points.

Une telle expérience a pu être réalisée à partir de ribosomes de Procaryotes *(fig. IV-4)*. Une sous-unité 30S de bactérie qui contient une seule molécule d'ARN (16S) est traitée pendant quelques minutes par de la ribonucléase (hydrolyse douce) ; l'ARN est ensuite extrait de la sous-unité. On récupère alors 6 fragments d'ARN.

Ce type d'expérience permet de conclure que la molécule d'ARN 16S possède 6 points d'affleurement en surface de la sous-unité 30S (la localisation des points d'affleurement sur le schéma est tout à fait arbitraire).

- **Les protéines peuvent être localisées par immunocytochimie**

La localisation des protéines dans le ribosome reste difficile dans la mesure où, comme nous l'avons vu, les protéines constitutives du ribosome sont toutes différentes. Le développement des méthodes d'immunocytochimie dans les dernières années a permis de faire avancer ce problème. Les localisations ont surtout concerné les ribosomes d'*Escherichia coli*.

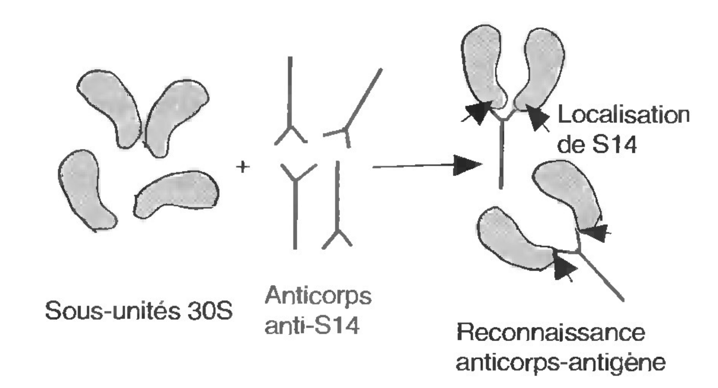


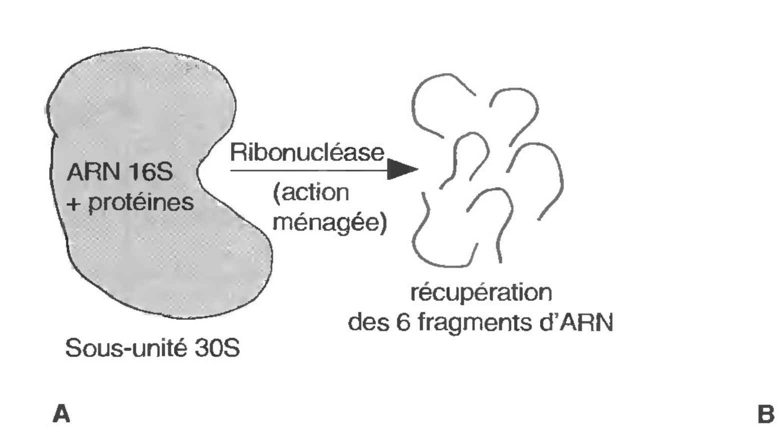
Fig. IV-5 : Localisation de la protéine S14 dans la sous-unité 30S du ribosome de Procaryote par immunocytochimie.

L'approche peut être la suivante *(fig. IV-5)* :

– les sous-unités des ribosomes sont dissociées et les protéines de la petite sous-unité 30S sont séparées et purifiées. On purifie par exemple la protéine S14 (S de l'anglais *small*, petit, pour la petite sous-unité). Des anticorps polyclonaux anti-S14 sont préparés par injection de la protéine à un lapin ;

– les petites sous-unités sont incubées en présence du polysérum contenant les anticorps anti-S14 ;

– les anticorps réagissent avec une ou deux sous-unités (rappelons que les anticorps sont bivalents et possèdent deux sites de fixation pour les antigènes) ; il se forme ainsi des dimères de sous-unités. La fraction peut être étalée sur grille et observée au microscope électronique en contraste négatif.



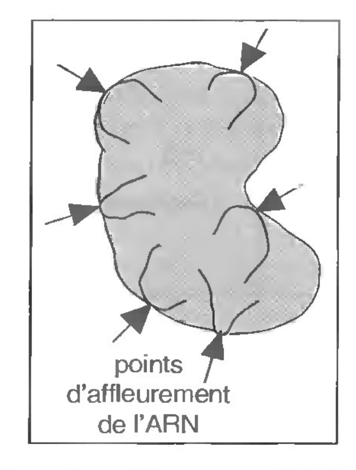


Fig. IV-4 : Mise en évidence des points d'affleurement de l'ARNr 16S dans la petite sous-unité du ribosome de Procaryote.

A) Expérience d'hydrolyse ménagée du ribosome par la RNase.

B) Interprétation. L'expérience montre qu'il existe probablement 6 points d'affleurement de l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S du ribosome. La localisation sur le schéma reste arbitraire.

Cette expérience apporte deux types d'informations: 1) la protéine S14 affleure en surface du ribosome; 2) la protéine S14 peut être localisée par rapport à la morphologie du ribosome (en réalité elle se situe dans le tiers supérieur de la petite sous-unité).

En multipliant ces approches et en les associant à d'autres types d'observations (la diffraction aux rayons X, ou des expériences de réassemblage de sous-unités ribosomales en présence de protéines deutérées, c'est-à-dire dans lesquelles des atomes d'hydrogène ont été remplacés par du deutérium et qui sont donc repérables), il est devenu possible d'établir de véritables *« cartes » des ribosomes* et de proposer des modèles d'organisation tridimensionnelle. Des modèles sont aussi proposés montrant les voies possibles de cheminement de l'ARNm et du polypeptide en cours de synthèse dans le ribosome assemblé, pendant la traduction *(fig. IV-6)*. Toutefois le rôle exact des différents partenaires moléculaires constituant le ribosome est loin d'être parfaitement élucidé.

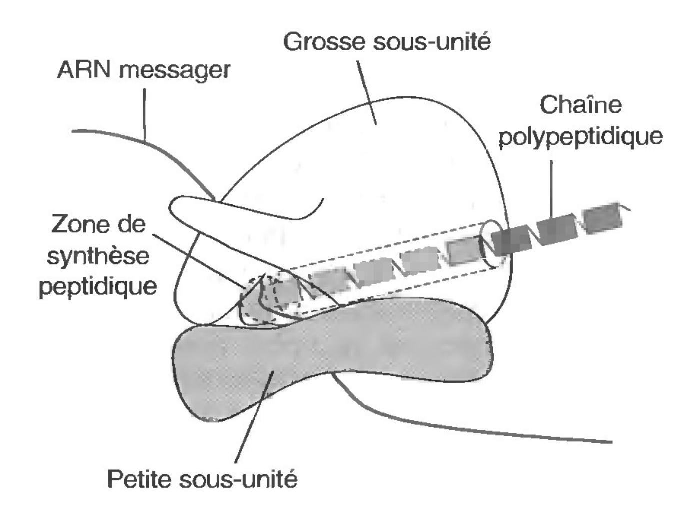


Fig. IV-6: Modèle possible de ribosome de Procaryote.
Le schéma montre le siège de la synthèse peptidique et l'émergence du peptide naissant à la base de la grosse sous-unité, éventuellement au débouché d'un tunnel. Le trajet de l'ARN messager reste plus hypothétique.

- **Chez les Procaryotes l'assemblage des ribosomes est un autoassemblage**

La première reconstitution *in vitro* de la petite sous-unité ribosomale d'*Escherichia coli* fut réalisée en 1968. Elle consistait à rassembler dans un tube à essais l'ARNr 16S et les 21 protéines constitutives de la sous-unité 30S. La sous-unité ainsi reconstruite était une sous-unité 30S normale sur le plan morphologique et surtout fonctionnel *.

Une telle reconstitution est un véritable **autoassemblage** dans la mesure où aucun composant supplémentaire n'est ajouté (en particulier *aucune enzyme et aucune source d'énergie*). En réalité cet assemblage se fait *par étapes*, la reconnaissance spontanée de certaines protéines compatibles induisant des changements de conformation de l'ARNr favorisant à leur tour l'association de nouvelles protéines. Cet assemblage spontané séquentiel conduit à la formation d'un véritable ***puzzle ribosomal*** dont l'ordre de montage est imposé; il dépend de la structure primaire des protéines.

* Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'assemblage des ribosomes eucaryotes est plus complexe.

2.2. L'ARN MESSAGER (ARNm) ET LE CODE GÉNÉTIQUE

L'importance du message porté par l'ARNm et le décryptage du code inscrit dans ce message ont été révélés dans les années 1960 grâce à des expériences menées en *milieu acellulaire* avec toute la « machinerie » de synthèse.

A. *Synthèse en milieu acellulaire. Stimulation par addition d'ARNm*

Un *système acellulaire* de synthèse protéique est obtenu à partir de cellules dont la membrane plasmique est lysée de façon à récupérer le contenu cellulaire. Les bactéries, qui sont des cellules très simples, sont souvent utilisées dans ces expériences. Chez les Eucaryotes on choisit souvent des cellules pauvres en organites, par exemple les réticulocytes.

Soit l'expérience suivante :

• Des cellules d'*Escherichia coli* en croissance active sont concentrées par centrifugation, puis ouvertes de façon à récupérer le contenu cellulaire. Elles sont traitées par la DNase pour casser l'ADN. Par des centrifugations successives on élimine les fragments d'ADN, les fragments de paroi et de membrane plasmique ; on récupère ainsi un « *suc cellulaire* » contenant en particulier :
– des polysomes isolés (ARNm + ribosomes) ;
– des ribosomes libres ;
– des ARN de transfert (ARNt) ;
– des enzymes d'activation et des facteurs protéiques impliqués dans la traduction (voir plus loin).

• Ce suc cellulaire est repris dans un tampon et sont ajoutés (*figure IV-7*) :
– de l'ATP et du GTP comme sources d'énergie ;
– du magnésium (la concentration ne doit pas être trop importante pour ne pas provoquer une association prématurée des sous-unités ribosomales) ;
– des acides aminés radioactifs.
Ceci constitue le *milieu d'incubation acellulaire.*

• Après un temps d'incubation on précipite les protéines. Les acides aminés libres restent en solution. Les précipités sont lavés et leur radioactivité est mesurée sur un compteur à scintillation.

Le fait que des précipités soient radioactifs indique qu'une incorporation d'acides aminés marqués a eu lieu et qu'**une synthèse protéique s'est produite pendant l'incubation.**

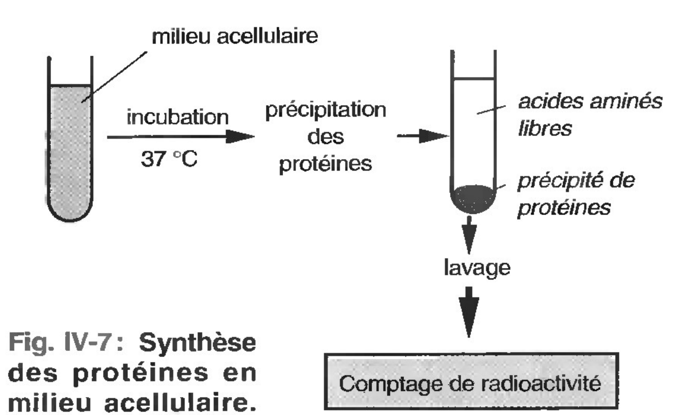


Fig. IV-7 : Synthèse des protéines en milieu acellulaire.

La mesure au compteur à scintillation permet en outre d'**estimer la quantité de protéines synthétisées** pendant le temps de l'expérience.

Si, à partir du même type d'expérience, on fait une cinétique d'incorporation d'acides aminés, en même temps que l'on mesure la quantité d'ARNm dans le système, on obtient une courbe comme sur la *figure IV-8*. La synthèse, d'abord linéaire dans les premières minutes, est rapidement freinée, et ceci corrélativement à une destruction de l'ARN messager. Dans les conditions acellulaires, il apparaît ainsi que l'ARNm, non protégé, est rapidement dégradé par les ribonucléases présentes dans l'extrait. Le seul fait de rajouter de l'ARNm permet à la synthèse de reprendre. L'expérience indique l'***importance de l'ARN messager pour la synthèse des protéines***.

De telles expériences *in vitro* furent continuées avec d'autres systèmes. Elles ont permis par exemple la synthèse en milieu acellulaire, grâce à la machinerie bactérienne, de protéines virales (protéines de la capside) et même de protéines d'Eucaryotes. Dans chaque cas ***la production de protéines est déterminée par l'addition d'un ARNm exogène à un extrait démuni de son messager d'origine***.

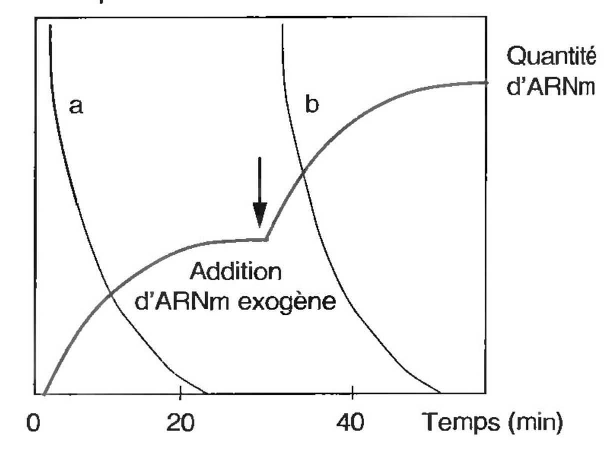


Fig. IV-8 : Cinétique d'incorporation d'acides aminés et dégradation de l'ARNm dans une synthèse protéique en milieu acellulaire.
La courbe en trait rouge montre la cinétique d'incorporation avec reprise lorsque de l'ARNm exogène est ajouté au système. La courbe (a) indique la dégradation de l'ARNm endogène, la courbe (b) la dégradation de l'ARNm exogène.

B. Le code génétique

C'est le problème du « *dictionnaire cellulaire* » c'est-à-dire de la correspondance entre les 4 bases constituant la séquence de l'ARNm et les 20 acides aminés constituant la séquence des polypeptides.

Le principe des recherches concernant le code génétique a été au départ fondé sur plusieurs hypothèses : 1) si 1 base de l'ADN correspond à 1 acide aminé, la cellule ne pourrait coder que 4 acides aminés, ce qui est insuffisant (en effet il existe 20 acides aminés) ; 2) si 2 bases correspondent à 1 acide aminé, on a 4^2 combinaisons donc la possibilité de coder 16 acides aminés (ce qui est encore insuffisant) ; 3) si 3 bases correspondent à 1 acide aminé on a 4^3 combinaisons donc la possibilité de coder 64 acides aminés.

C'est donc la troisième hypothèse qui fut retenue dans la mesure où il existe 20 acides aminés. Elle fut confirmée par des mesures de tailles d'ARNm codant des protéines dont le nombre d'acides aminés était connu.

Les premières expériences concluantes permettant d'établir la correspondance exacte entre 3 bases (= un **codon**) et 1 acide aminé furent les expériences de NIREMBERG et de son équipe en 1961 utilisant des ARNm artificiels (ARNm de synthèse) :

– un extrait acellulaire était préparé contenant toute la machinerie de synthèse protéique excepté les ARNm ; l'extrait était réparti dans 20 tubes d'incubation ; dans chaque tube des acides aminés étaient ajoutés dont un seul était radioactif ;

– dans tous les tubes un ARNm de synthèse contenant seulement un nucléotide était alors ajouté, par exemple un **ARNm poly U** ;

– après incubation la radioactivité était mesurée dans tous les tubes. Il apparut que le tube où une protéine radioactive était présente correspondait au tube dans lequel avait été ajoutée la phénylalanine radioactive. La protéine synthétisée *in vitro* contenait exclusivement la phénylalanine.

Le premier codon était ainsi décrypté et la conclusion était que le ***triplet UUU était le codon de la phénylalanine***. La *figure IV-9* montre le résultat de ce type d'expérience fondée sur l'utilisation de 3 mononucléotides.

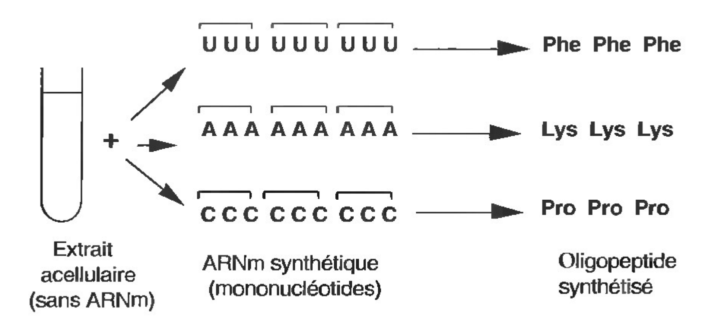


Fig. IV-9 : Synthèse d'oligopeptides à partir de mononucléotides de synthèse.

En multipliant les expériences avec des *dinucléotides et des copolymères mixtes* le **code génétique** fut ensuite complètement décrypté *(tab. IV-2)*. Quelles sont les caractéristiques de ce code génétique ?

– **Le code n'est pas ambigu** puisqu'aucun codon ne code pour plusieurs acides aminés.

– **Le code est dégénéré**. Pour 1 acide aminé il existe en effet plusieurs codons sur l'ARNm (on dit aussi que le code est *redondant*). La dégénérescence n'est pas la même pour tous les acides aminés. Ainsi certains acides aminés correspondent à 6 codons (sérine, arginine, leucine), d'autres à 4 codons (proline, alanine), d'autres à 3 codons (isoleucine), d'autres à 2 codons (phénylalanine). Seuls la méthionine et le tryptophane sont déterminés par un seul codon.

Parmi les « synonymes » on remarque que la différence porte en général sur la troisième base du triplet. Par exemple l'arginine est codée par

CGU
CGC
CGA
CGG

C'est cette troisième base qui permettra une souplesse dans l'appariement avec l'anticodon de l'ARNt : c'est le *flottement* ou *déhanchement* (*wobble* des anglo-saxons). On connaît les règles canoniques d'appariement :

C—G
A—U
U—A
G—C

Dans l'appariement non canonique autorisé par le *wobble*, les règles sont sensiblement dif-

TABLEAU IV-2
Le code génétique

Deuxième position

Première position extrémité 5'	U	C	A	G	Troisième position extrémité 3'
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr *UAA Stop* *UAG Stop*	UGU Cys UGC Cys *UGA Stop* UGG Trp	U C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G

férentes. Elles impliquent en outre la présence fréquente de nucléotides inhabituels tels l'inosine (voir plus loin). Les possibilités d'appariement sont les suivantes :

Base présente en position 5' (anticodon de l'ARNt)	Base reconnue en position 3' codon de l'ARNm
C	G
A	U
U	A ou G
G	C ou U
I (inosine)	A, U ou C

La conséquence est qu'un ARNt a la possibilité de reconnaître plus d'un codon de l'ARN messager ; réciproquement il permet à un codon d'être reconnu par plusieurs espèces d'ARNt.

– **Le code est ponctué**. 61 codons sur 64 ont une correspondance avec un acide aminé. Les autres servent soit de codon initiateur (AUG) soit de codons d'arrêt ou **codons stop** (UAA, UAG et UGA).

– **Le code est non chevauchant**. Il n'existe pas de nucléotides non codants entre deux codons.

– **Le code est universel**. Le même code génétique est retrouvé depuis les Procaryotes jusqu'aux Eucaryotes. Seules les mitochondries, organites semi-autonomes des Eucaryotes, ont un code génétique légèrement différent (voir 2e partie, chap. VIII).

2.3. LES ARN DE TRANSFERT (ARNt) COMME « ADAPTATEURS »

Le troisième partenaire impliqué dans la traduction est l'ARN de transfert, c'est-à-dire la molécule qui permettra le placement rigoureux de chaque acide aminé dans un polypeptide en croissance, en fonction du message codé par l'ARNm.

A. Rappel de l'organisation d'un ARNt

La structure de l'ARNt a déjà été abordée (chap. VI, 1re partie). La *figure IV-10* présente une organisation plus complète d'un ARN de

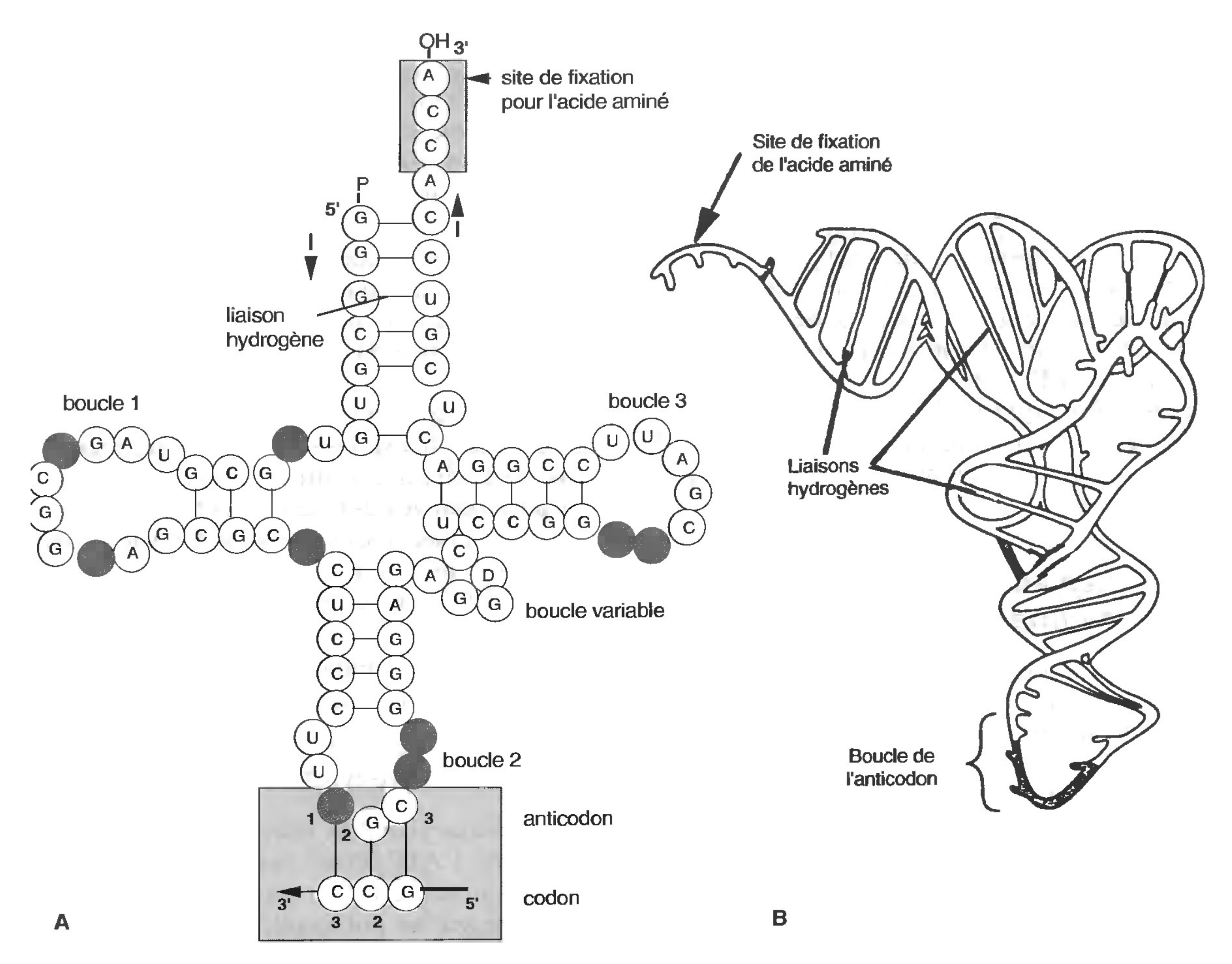


Fig. IV-10 : Organisation d'un ARNt.

A) Séquence primaire et organisation de boucles et des sites stratégiques. Les bases en grisé sont des bases « inhabituelles » autres que A, G, C ou U. Parmi celles-ci on remarque par exemple la présence de l'inosine en première position de l'anticodon.

B) Reconstitution tridimensionnelle d'un ARNt.

transfert. On y reconnaît la forme générale en « feuille de trèfle » avec les boucles latérales et la boucle variable, et surtout les 2 régions importantes pour la traduction :

– la région de l'**anticodon**, c'est-à-dire une séquence de 3 nucléotides complémentaires du codon de l'ARNm, donc le véritable décodeur du système ;

– l'extrémité OH 3', ou bras accepteur, qui est le **site de fixation** pour un acide aminé (celui codé par le codon reconnu). Elle se termine par CCA pour tous les ARNt, l'acide aminé étant attaché au nucléotide Adénosine de cette séquence.

Il existe plusieurs espèces différentes d'ARNt. Du fait de la très haute conservation de leur structure primaire, ces ARNt adoptent des structures secondaires et tertiaires similaires, en particulier la configuration tridimensionnelle en forme de L *(fig. IV-10, B)*. C'est par leur anticodon que les ARNt sont différents. Il y a environ 30 à 40 ARNt différents chez les Procaryotes (bactéries) et 50 ARNt différents chez les Eucaryotes, c'est-à-dire plus qu'il est nécessaire pour encoder 20 acides aminés. On comprend ainsi qu'il existe probablement 20 familles d'ARNt parmi lesquelles plusieurs ARNt peuvent

s'attacher au même acide aminé. On parle alors d'*isoaccepteurs*.

Comme nous l'avons vu précédemment, le système est également souple grâce aux possibilités d'appariement avec jeu *(wobble)* au niveau de la première base de l'anticodon. Dans les ARNt les plus souples, la position de flottement (position 1 de l'anticodon) est souvent occupée par l'inosine, un analogue de la guanosine, dont le carbone 2 ne porte pas de fonction amine. L'inosine peut s'apparier à la cytosine, à l'adénine ou à l'uracile. On comprend ainsi que l'ARNt portant l'inosine en position de flottement pourra décoder plusieurs codons différents, donc positionner plusieurs acides aminés.

B. Les aminoacyl-ARNt synthétases activent l'ARNt

La question est maintenant de comprendre comment une molécule d'ARNt s'attache à l'acide aminé approprié. Cette reconnaissance se fait grâce à des enzymes, les **aminoacyl-ARNt synthétases**. Il existe environ 20 enzymes, toutes présentes dans le cytoplasme, **capables de reconnaître à la fois l'acide aminé et l'ARNt correspondant** (ou les isoaccepteurs, selon les cas) **et de permettre leur couplage**. La réaction consomme de l'énergie, l'enzyme doit donc aussi être capable de fixer une molécule d'ATP. Là encore l'enzyme de couplage joue en quelque sorte un rôle ***d'adaptateur*** en permettant ce couplage *(fig. IV-11)*. Il se forme une liaison covalente, riche en énergie entre l'ARNt et l'acide aminé.

La réaction de couplage nécessite de l'énergie et se fait en deux temps. Dans un premier temps, l'acide aminé est activé par liaison de l'AMP permise par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP : **l'acide aminé est alors adénylé**. Ensuite, le groupement carboxyle de l'acide aminé adénylé est transféré sur un groupement OH de l'adénine terminale de l'ARNt (voir encadré pour les données récentes concernant cet attachement). Ces deux étapes sont effectuées au sein de l'aminoacyl-ARNt synthétase et peuvent être résumées ainsi :

$$\text{Enzyme + acide aminé + ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{enzyme (aminoacyl-AMP) + PPi}$$

$$\text{ARNt + enzyme (aminoacyl-AMP)} \rightarrow \text{aminoacyl-ARNt + AMP + enzyme}$$

L'aminoacyl-ARNt retient l'énergie contenue dans l'ATP. Dans cet aminoacyl-ARNt l'acide aminé est donc **activé** et pourra être transféré sur un polypeptide en cours de synthèse.

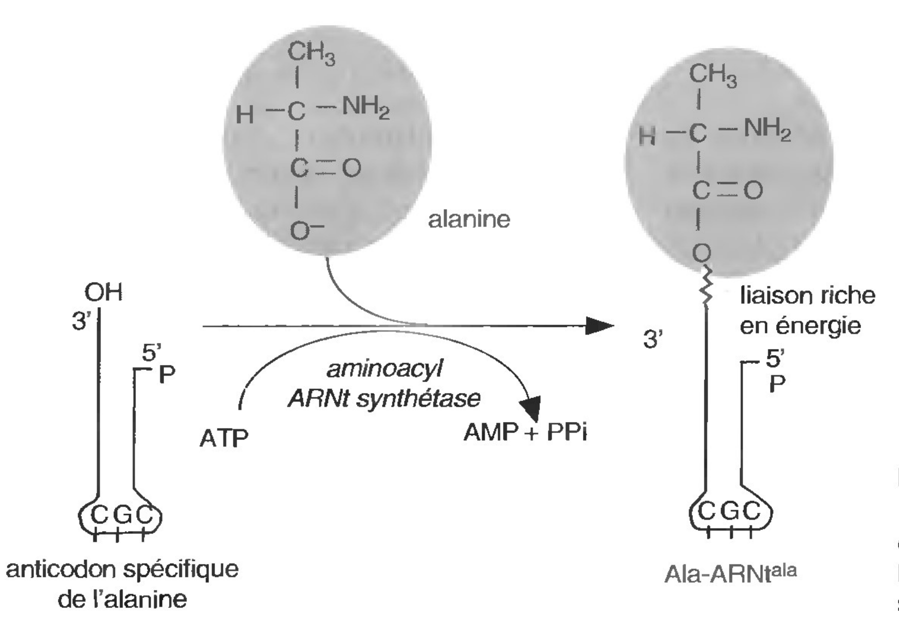
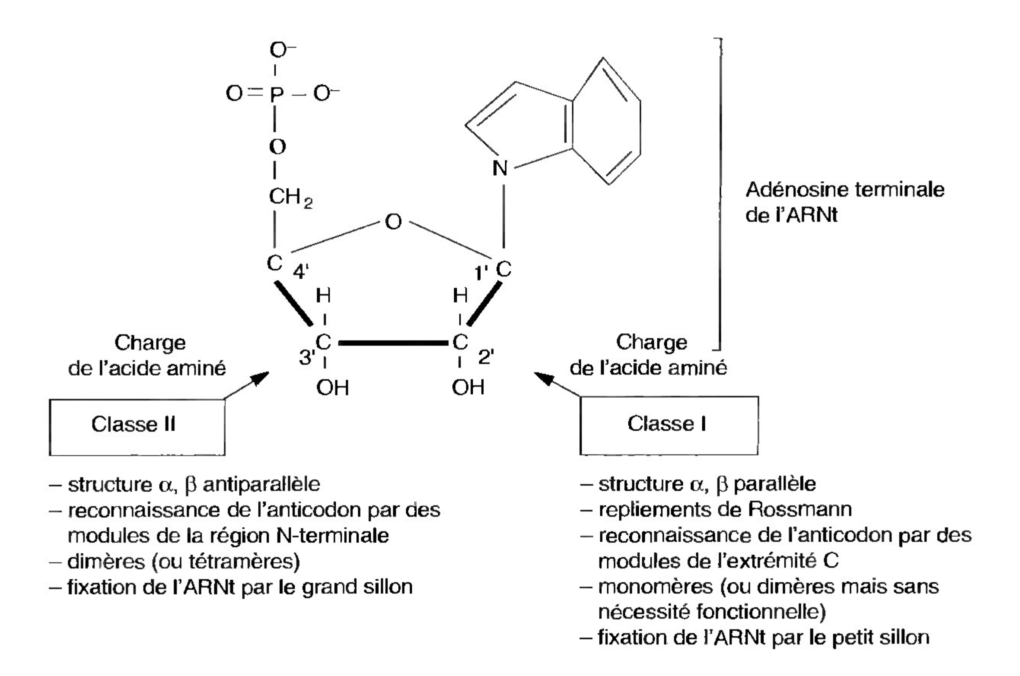


Fig. IV-11 : Activation d'un ARNt. Il s'agit ici d'un $ARNt^{ala}$ qui se charge d'un résidu alanine grâce à l'intervention d'une aminoacyl-ARNt synthétase spécifique.

LES AMINOACYL-ARNT SYNTHÉTASES ET LA FIDÉLITÉ DE LA TRADUCTION : DE NOUVELLES HYPOTHÈSES QUANT À L'ORIGINE DU CODE GÉNÉTIQUE ?

Les aminoacyl-ARNt synthétases constituent une famille de 20 enzymes dont le rôle fondamental est de permettre « l'accrochage » sur la chaîne peptidique naissante du bon acide aminé au bon moment et au bon endroit. Depuis de nombreuses années, cette famille a constitué une énigme pour les biologistes. La question se pose toujours de comprendre comment fonctionnent, avec tant de fidélité, ces enzymes qui catalysent des réactions apparemment identiques (la fixation d'un acide aminé sur un ARNt homologue), avec des substrats soit identiques (comme l'ATP), soit de structure voisine (comme les acides aminés et les ARNt).

Les dernières décennies ont permis à plusieurs équipes d'effectuer l'analyse cristallographique de plusieurs aminoacyl-ARNt synthétases et de mieux comprendre les relations structure/fonction. De ces travaux encore récents, il ressort qu'il existe **deux classes d'aminoacyl-ARNt synthétases**, qui présentent des différences dans leur structure primaire et dans leur configuration tertiaire : motifs plus ou moins conservés, structures parallèles ou antiparallèles, présence ou non de repliements de Rossmann, c'est-à-dire d'une conformation souvent rencontrée comme une « signature » dans des polypeptides ayant des domaines de fixation des nucléotides. Quelle que soit la classe de ces enzymes, elles contiennent un domaine catalytique permettant la fixation de l'ATP (c'est là où les résidus sont les plus conservés), de l'acide aminé et de l'extrémité CCA du bras accepteur de l'ARNt (dans ces régions les résidus sont spécifiques de chaque classe). Des domaines additionnels, plus variables, sont probablement spécialisés dans la reconnaissance de l'anticodon. Une différence essentielle dans le fonctionnement de ces enzymes réside dans le fait que, selon les classes, **elles chargent leur acide aminé soit à l'extrémité 2'OH de l'adénosine terminale de l'ARNt (pour la classe I) soit à l'extrémité 3'OH de l'adénosine terminale de l'ARNt (pour la classe II)**.



La découverte de ces deux classes d'enzymes qui diffèrent par leur structure tertiaire et le site d'accrochage de l'acide aminé n'est pas sans conséquences et a amené certains chercheurs à proposer de nouvelles hypothèses concernant l'origine du code génétique et de son évolution. Sans entrer ici dans le détail de toutes les discussions sur ce sujet, les données soulignent l'importance de l'ARN et plus précisément du ribose qui en fait partie intégrante. Il est maintenant admis que l'ARN possède des propriétés autocatalytiques en particulier au cours du mécanisme post-transcriptionnel et que cette capacité d'autocatalyse est sans doute très primitive (voir p. 222). Concernant la synthèse des protéines, certains auteurs suggèrent aussi un rôle catalytique de l'ARN dans la « soupe prébiotique », le « monde ARN » tel qu'on l'imagine actuellement : **cet ARN aurait été capable d'accrocher et/ou de transférer directement les peptides sur les deux groupements OH du ribose, et ceci sans code génétique.** Au cours de l'évolution et de la complexification qu'elle a amenée, cet acte catalytique aurait été dévolu à des protéines capables de reconnaître ces deux cibles réactionnelles de chiralité différente : ainsi seraient apparues les deux classes d'aminoacyl-ARNt synthétases.

À partir du moment où l'ARNt est chargé d'un acide aminé, la complémentarité codon/anticodon guide l'ARNt au site de synthèse. L'ARNt doit donc porter le « bon » acide aminé. Une expérience élégante montre que c'est en effet l'ARNt seul qui détermine le site où l'acide aminé doit être positionné dans le polypeptide *(fig. IV-12)*. Si l'on transforme chimiquement, par hydrogénation en présence de nickel, un acide aminé lié à son ARNt spécifique (par exemple si l'on remplace la cystéine par l'alanine), cet ARNt « se trompe » et insère le résidu alanine en un site où devrait se trouver la cystéine. On voit ici l'importance de l'identification de l'ARNt par des ***aminoacyl-ARNt synthétases spécifiques***.

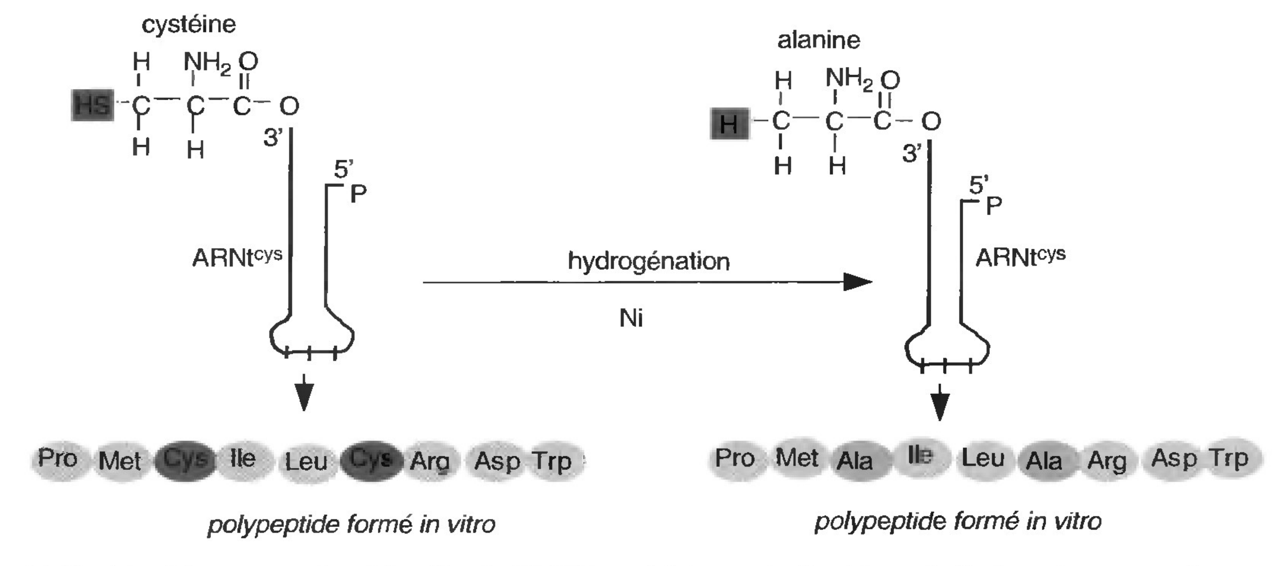


Fig. IV-12 : Expérience montrant le rôle de l'ARNt seul (et non de l'acide aminé) dans la reconnaissance du site où doit être inséré un acide aminé.

3. LES ÉTAPES DE LA TRADUCTION CHEZ LES PROCARYOTES

3.1. ORGANISATION DE L'ARN MESSAGER ET SON RÔLE DANS LA TRADUCTION

Contrairement aux autres molécules d'ARN (ARNt et ARNr) qui ont des tailles relativement définies, les molécules d'ARNm ont des tailles très hétérogènes. Cette hétérogénéité est due :

– à une inégalité de longueur des régions codantes, dans la mesure où elles codent des polypeptides de tailles très variables ;

– à une inégalité de longueur des régions non codantes qui ne seront pas traduites en acides aminés, séquences de tête de l'extrémité 5' et séquences de queue de l'extrémité 3' (voir chap. III, 2e partie, pour ce qui concerne l'organisation des unités de transcription).

Chez les Procaryotes, l'ARNm est **polycistronique**, c'est-à-dire que l'unité de transcription peut correspondre à l'existence de plusieurs gènes regroupés, qui peuvent être traduits simultanément. Les séquences codent pour plus d'une chaîne polypeptidique. En revanche, chez les Eucaryotes, l'ARNm est **monocistronique**, c'est-à-dire que l'unité de transcription correspond à un seul gène. Les séquences non traduites sont essentielles à la synthèse protéique, en particulier pour la fixation correcte de l'ARNm aux ribosomes.

On distingue classiquement 3 phases dans le phénomène de traduction: l'initiation, l'élongation-translocation et la terminaison. Ces étapes vont être analysées chez les Procaryotes où elles sont maintenant bien connues. Les étapes se déroulent dans le ribosome qui, lorsqu'il est assemblé, possède deux sites susceptibles d'être occupés par les ARNt:

– le *site A* (ou aminoacyl) qui reçoit les aminoacyl ARNt entrants;

– le *site P* (ou peptidyl) où est localisé l'ARNt portant le polypeptide en formation *(fig. IV-13)*. Seul le premier ARNt est positionné directement dans le site P (voir plus loin).

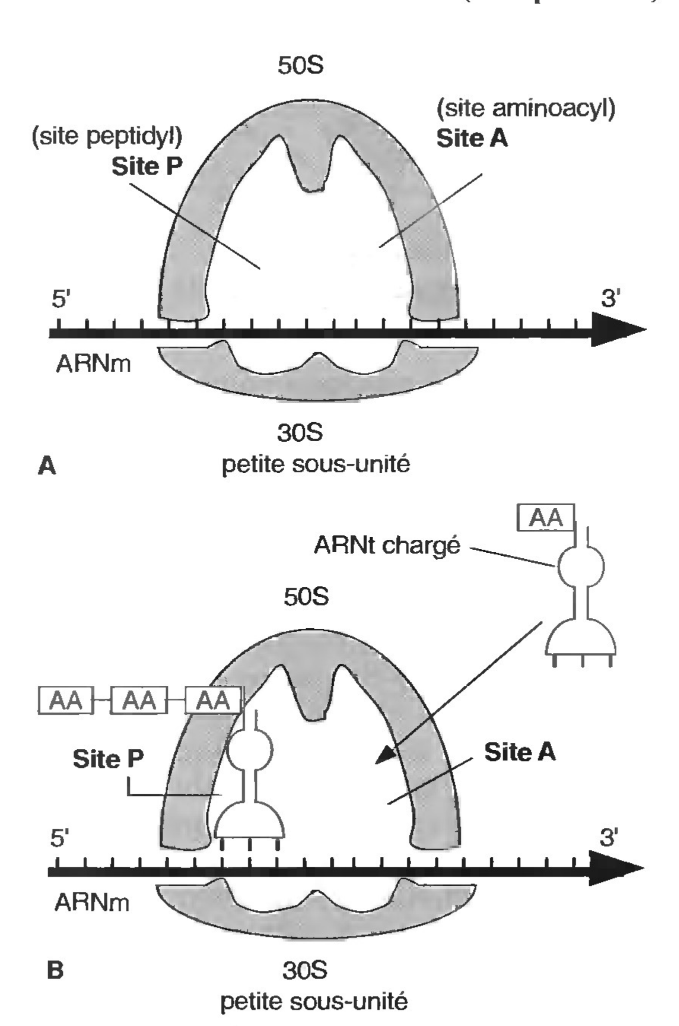


Fig. IV-13: Organisation schématique d'un ribosome assemblé.

A) Ribosome assemblé « vide » (situation non rencontrée dans la cellule) montrant les sites peptidyl (site P) et aminoacyl (site A).

B) Ribosome assemblé, au cours de la synthèse protéique, montrant le positionnement dans le site P de l'ARNt portant le peptide naissant, et l'arrivée dans le site A de l'ARNt activé « entrant ».

3.2. INITIATION *(fig. IV-15)*

C'est la phase qui permet d'associer à un ribosome l'ARNm ainsi que le premier ARNt. Chez les Procaryotes (en particulier les bactéries), le premier acide aminé incorporé est toujours la N-formyl-méthionine (f-Met), c'est-à-dire une méthionine dont la fonction amine est bloquée par le N-formyl *(fig. IV-14)*. Elle est codée par le codon initiateur AUG.

Le ribosome est guidé à l'ARNm par une séquence de nucléotides située vers l'extrémité 5' de celui-ci:

5'–UAAGGAGG ---------------- AUG
5 à 10 nucléotides.

C'est la séquence de SHINE-DALGARNO. Cette séquence (ou au moins une partie de cette séquence) est complémentaire d'une séquence proche de l'extrémité 3' de la molécule d'ARNr de la petite sous-unité et l'appariement est donc possible.

L'initiation de la traduction commence par la formation d'un complexe entre la petite sous-unité ribosomale 30S, le f-Met-ARNt et une molécule d'ARNm *(fig. IV-15, A)*. Ce positionnement se fait en présence d'un facteur d'initiation IF-3 qui s'associe à la sous-unité 30S *(fig. IV-15, B)*. Le f-Met-ARNt se fixe alors sur le site peptidyl (site P, c'est-à-dire le site où sera localisé le polypeptide en formation) de la sous-unité 30S grâce à un facteur d'initiation IF-2 et une molécule de GTP *(fig. IV-15, C)*.

Enfin un troisième facteur IF-1 se lie au complexe ce qui permet à la grosse sous-unité 50S de s'associer. La fixation de 50S a pour

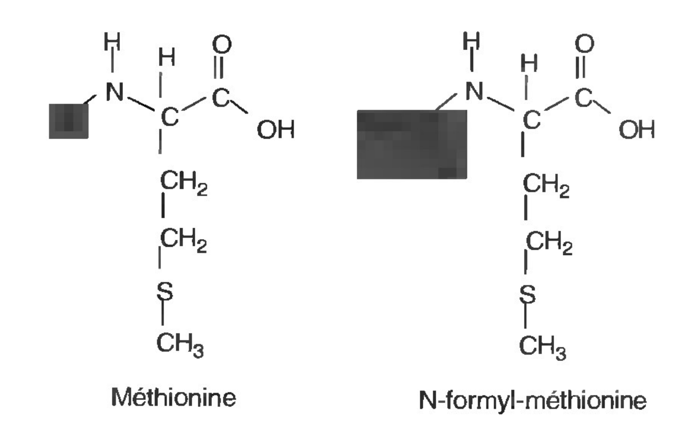


Fig. IV-14: Méthionine et formyl-méthionine.

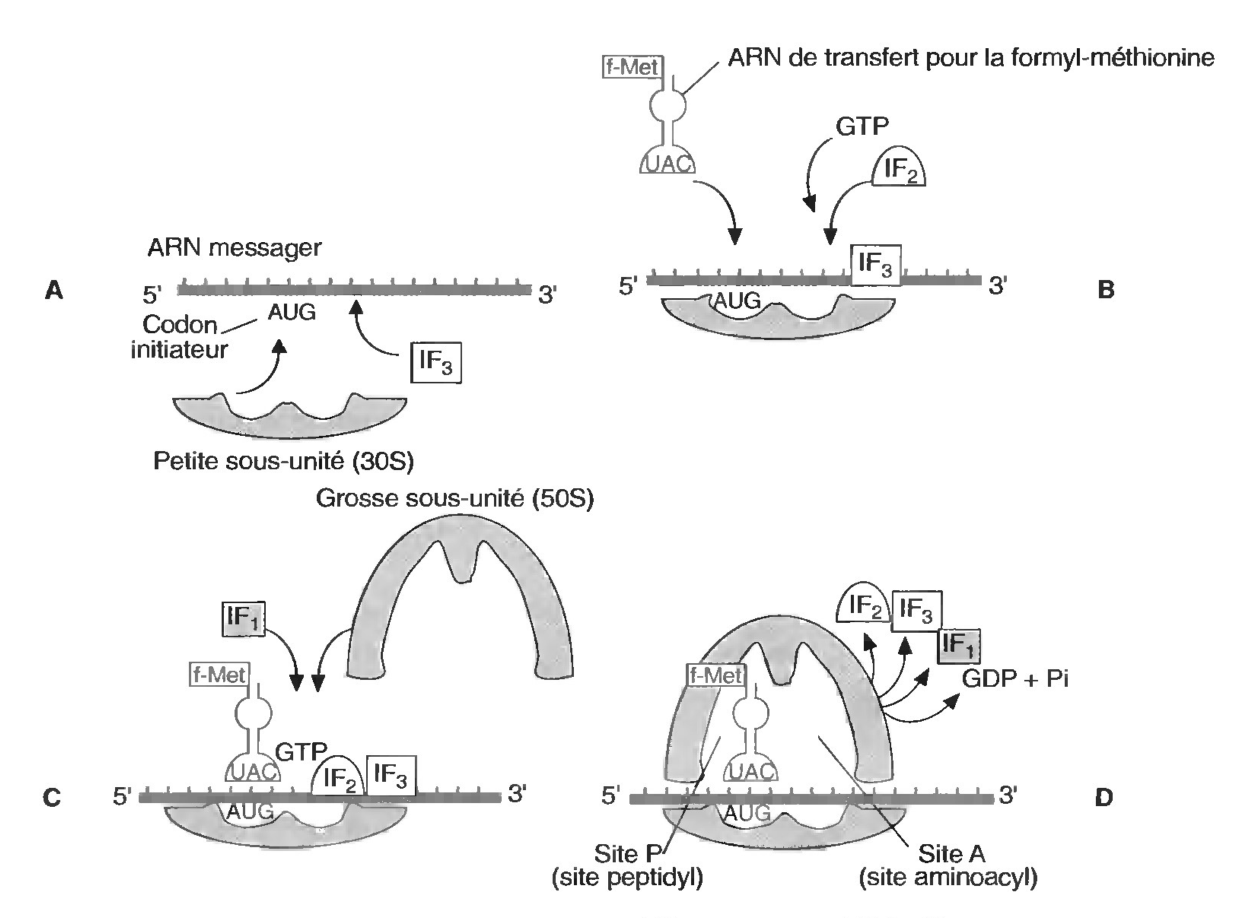


Fig. IV-15 : Initiation de la synthèse protéique.

conséquence le relargage de IF-3, l'hydrolyse de GTP et le relargage de IF-2 et IF-1 *(fig. IV-15, D)*.

Au total il s'est formé un **complexe d'initiation** (ribosome 70S-ARNm et le f-Met-ARNt positionné sur le site P). Pour cette étape 3 facteurs protéiques ont été utilisés et une molécule de GTP a été hydrolysée. Environ 30 nucléotides sont en contact avec un seul ribosome (sur le schéma on a représenté moins de nucléotides pour plus de clarté).

3.3. ÉLONGATION ET TRANSLOCATION *(fig. IV-16)*

Lorsque l'initiation est achevée un deuxième ARNt chargé (il porte un deuxième acide aminé AA2, par exemple la phénylalanine sur la *figure IV-16*) se positionne dans le site aminoacyl du ribosome (site A, c'est-à-dire le site où se positionnent les ARNt activés, excepté le premier f-Met-ARNt). L'ARNt qui se fixe est défini par le codon adjacent au codon initiateur AUG de l'ARNm. Ce positionnement implique là encore la fixation d'un facteur protéique d'élongation EF-Tu et d'une molécule de GTP *(fig. IV-16, A et B)*.

La première liaison peptidique se forme alors entre les deux acides aminés présents grâce à l'intervention d'une **peptidyl-transférase** faisant partie intégrante de la sous-unité 50S. La liaison se fait entre le groupement carboxyle de la f-méthionine (rappelons que le groupement formyl bloque le groupement NH_2) et le groupement NH_2 libre de la phénylalanine *(fig. IV-16, C, et 17)*. Il faut remarquer ici que le positionnement à « bon niveau » et à « bonne distance » des acides aminés en cours d'association est probablement dû à la conformation des ARNt : en effet la distance entre l'extrémité 3' de l'ARNt (où est attaché l'acide aminé) et l'anticodon est toujours la même dans toutes les familles

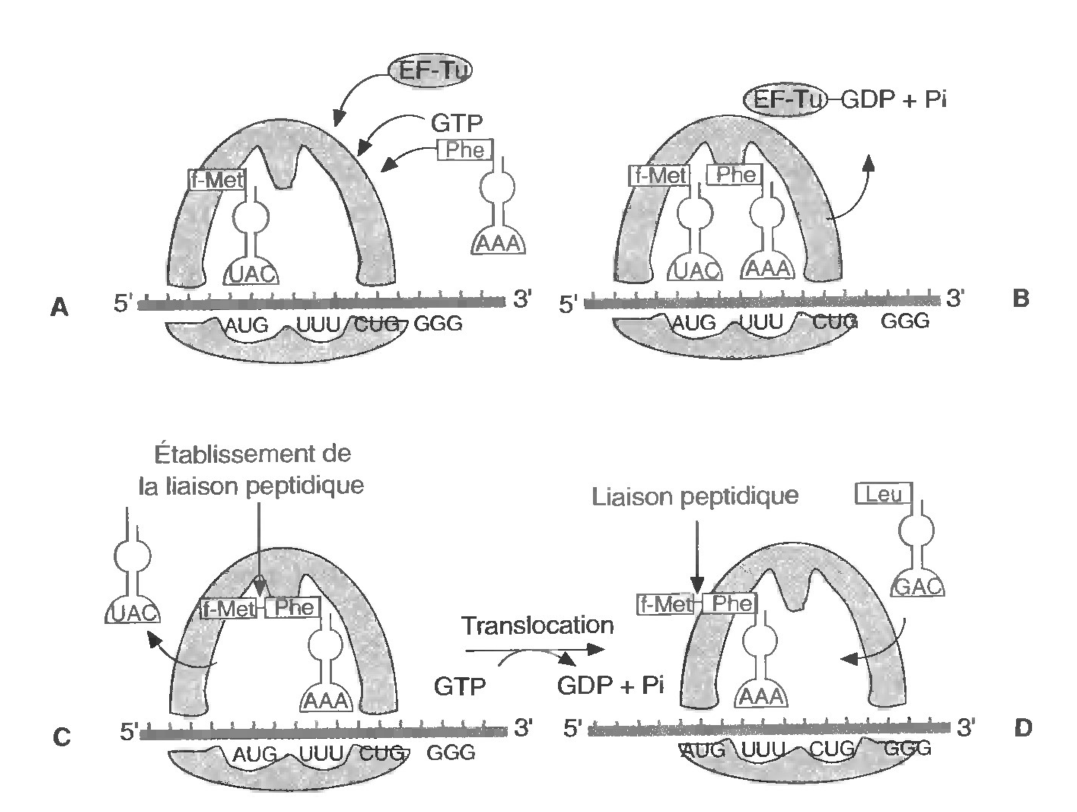


Fig. IV-16 : Élongation et translocation.

d'ARNt (n'oublions pas que la séquence primaire est conservée).

Une fois la liaison peptidique établie, l'ARNt^{Phe} porte alors le dipeptide formyl-méthionine-phénylalanine. L' ARNt$^{f\text{-}Met}$ est libéré. Il se produit alors un glissement du ribosome, par saut de 3 bases, et l'ARNt portant la chaîne polypeptidique en voie d'élongation passe du site A au site P. Cela requiert un autre facteur (souvent appelé translocase)

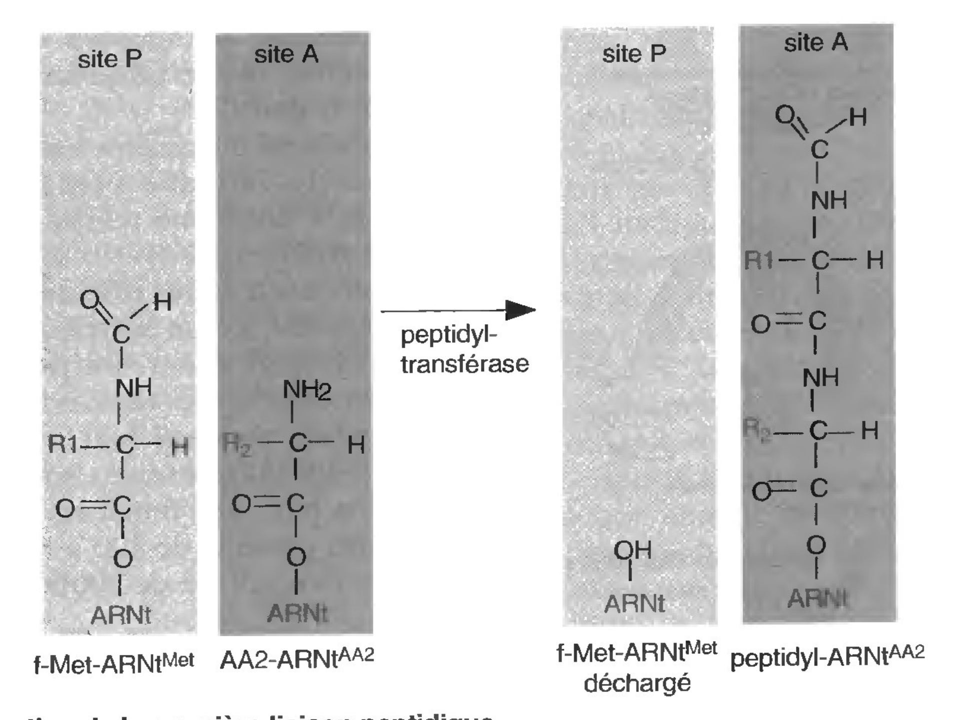


Fig. IV-17 : Formation de la première liaison peptidique.

et l'utilisation d'un GTP. C'est le mécanisme de **translocation** *(fig. IV-16, D)*.

Le site A redevenu vacant peut alors accepter le prochain ARNt activé dont la spécificité est à nouveau déterminée par la séquence des codons sur l'ARNm.

Au total un facteur protéique, une molécule de GTP et une enzyme peptidyl-transférase ont été utilisés pour l'élongation, un facteur protéique et une autre molécule de GTP ont été utilisés pour la translocation.

3.4. TERMINAISON DE LA CHAÎNE *(fig. IV-18)*

Dans le ribosome la chaîne peptidique naissante est enfouie au sein du ribosome et probablement protégée sur une assez grande longueur (35 acides aminés) dans le tunnel dont elle émerge à la base de la grosse sous-unité *(voir fig. IV-6)*.

La terminaison de la chaîne a lieu lorsque arrive au site A du ribosome un codon stop (UAA, UAG ou UGA). Aucune molécule d'ARNt ne possède en effet d'anticodon complémentaire de ces codons. Le site A reste vacant et la libération du polypeptide se fait grâce à l'intervention d'un facteur de dissociation (RF pour *release factor*). La peptidyl-transférase est activée et par son activité hydrolytique rompt la liaison entre le polypeptide et l'ARNt qui le porte. Le polypeptide est ainsi libéré.

Dans la chaîne polypeptidique ainsi formée le premier acide aminé est la f-Met. Après la libération de la chaîne cet acide aminé formylé est coupé à son tour de la chaîne par hydrolyse. Les sous-unités du ribosome se séparent et sont à nouveau disponibles pour la synthèse d'une nouvelle chaîne polypeptidique (avec le même ARNm ou avec un autre ARNm).

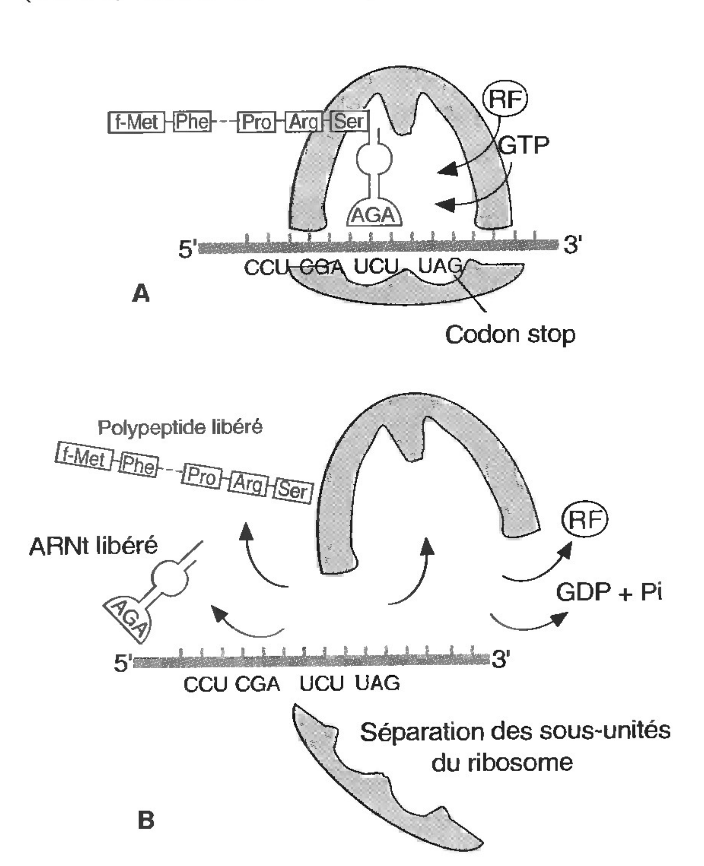


Fig. IV-18 : Terminaison de la chaîne.

3.5. LE FONCTIONNEMENT DES POLYSOMES

Dans les conditions optimales pour une bactérie du type *E. coli*, le temps mis pour la synthèse d'un polypeptide de 300 à 400 acides aminés est de l'ordre de 10 à 20 secondes. C'est donc un mécanisme extrêmement précis et rapide, mais très consommateur d'énergie. En même temps que se déroulent les étapes de la traduction, des liaisons s'organisent et le polypeptide acquiert déjà sa pré-configuration tridimensionnelle.

L'efficacité du système est souvent augmentée par le fait que plusieurs ribosomes « lisent » en même temps le message d'un même ARNm *(fig. IV-19)*. L'ARNm sert donc de matrice à d'autres ribosomes et l'on a alors un **polysome** (ou un polyribosome).

Le système est très efficace. Lorsqu'un ARNm est chargé au maximum, on trouve environ un ribosome tous les 80 nucléotides. Ainsi 12 à 20 ribosomes sont simultanément présents pour une molécule d'ARNm codant pour une protéine de 300 à 500 acides aminés (masse moléculaire de 300000 à 500000 Da).

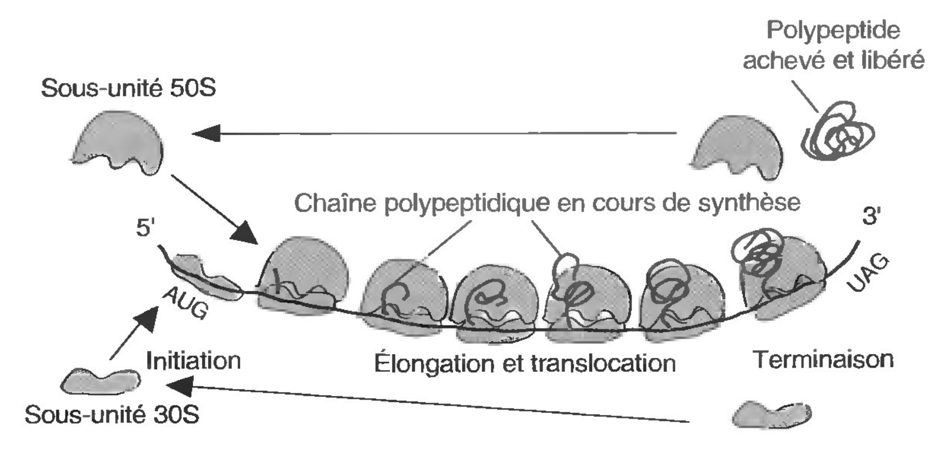


Fig. IV-19 : Fonctionnement d'un polyribosome pendant la synthèse protéique chez un Procaryote.

4. LES ÉTAPES DE LA TRADUCTION CHEZ LES EUCARYOTES

Le mécanisme de traduction a été décrit, au moins dans ses grandes lignes, chez les Procaryotes. Chez les Eucaryotes les mécanismes sont très semblables et ne seront pas envisagés dans le détail. Signalons seulement quelques différences.

Une différence porte sur le *premier acide aminé positionné* : il s'agit encore de méthionine, mais elle ne porte pas de groupement formyl. Le Met-ARNt^{met} s'associe avec la sous-unité 40S du ribosome.

Par ailleurs la nature et le moment d'intervention des facteurs pendant la traduction ne sont pas tout à fait semblables. Ainsi il existe au moins 5 ou 6 facteurs d'initiation qui sont nécessaires pour le bon fonctionnement de la traduction. L'un de ces facteurs est un gros complexe qui joue un rôle clé dans la recherche du codon AUG et la fixation de la petite sous-unité du ribosome.

La séquence consensus de l'ARNm qui guide les ribosomes sur ce dernier est différente :

5'-ACCAUGG.

Dans le cas des Eucaryotes il semble que le ribosome repère l'extrémité 5' de l'ARN messager.

Une autre différence très importante est liée à l'organisation respective des cellules Procaryotes et Eucaryotes. Chez les Procaryotes il n'existe pas d'enveloppe nucléaire séparant l'ADN du cytoplasme. Dans ces cellules la transcription et la traduction sont couplées, c'est-à-dire que la traduction peut commencer sur des molécules d'ARN messager en cours de synthèse. Au contraire, chez les Eucaryotes la compartimentation a pour conséquence une séparation de ces deux événements, la transcription ayant lieu dans le noyau et la traduction dans le cytoplasme après maturation des transcrits (voir chap. III, 2e partie).

5. AGENTS DE BLOCAGE DE LA TRADUCTION

De nombreux agents, dont les plus courants sont des antibiotiques utilisés pour la lutte anti-bactérienne en thérapeutique, bloquent la synthèse des protéines. Quelques exemples sont bien connus parmi lesquels on peut citer :

– la *streptomycine* qui se lie avec la sous-unité 30S et empêche l'initiation chez les Procaryotes ;

– la *puromycine* qui interrompt l'élongation des chaînes ; c'est en effet un **analogue structural** qui inhibe de façon compétitive la fixation des aminoacyl-ARNt *(fig. IV-20)*. Elle mime un ARNt chargé et se fixe à l'extrémité de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse sur le ribosome. La puromycine agit chez les Procaryotes et les Eucaryotes ;

– le *chloramphénicol* se fixe sur la sous-unité 50S des Procaryotes et inhibe l'action de la peptidyl-transférase ;

– une autre drogue, la *cycloheximide*, inhibe la peptidyl-transférase chez les Eucaryotes. Elle est utilisée en chimiothérapie pour limiter le développement des cellules cancéreuses.

Puromycine — *Aminoacyl-ARNt*

Fig. IV-20 : Agents de blocage de la traduction : exemple de l'analogie structurale entre la puromycine et un aminoacyl-ARNt.

6. LE ROUTAGE DES PROTÉINES DANS LA CELLULE EUCARYOTE

La *figure IV-21* résume les différents devenirs des protéines dans la cellule eucaryote. Selon le site de leur traduction et les signaux qu'elles contiennent, les protéines peuvent avoir dans la cellule des voies de routage très différentes. Certains aspects de ces événements sont traités dans d'autres chapitres (voir p. 297) et nous en résumons ici les lignes principales.

On distingue deux groupes de protéines :

1. Les protéines synthétisées sur les polysomes libres

Synthétisées entièrement dans le hyaloplasme, ces protéines ont un aiguillage post-traductionnel. Elles peuvent avoir quatre destinations principales :

– le *cytosol* lui-même où reste une très grande quantité de protéines : protéines du métabolisme énergétique et du métabolisme intermédiaire (voir chapitre VIII, 2e partie), protéines du cytosquelette (voir chapitre VI, 2e partie), protéines extrinsèques des membranes (voir chapitre I, 2e partie) ;

– le *noyau* vers lequel les protéines sont acheminées grâce à une séquence-signal NLS (*N*uclear *L*ocalisation *S*ignal), l'entrée dans le noyau étant contrôlée au niveau du canal du pore (voir p. 187 chap. II, 2e partie) ;

– les *organites semi-autonomes*, mitochondries et chloroplastes, vers lesquels les protéines sont acheminées, là encore, grâce à des séquences-signal, respectivement MTS (*M*ito-

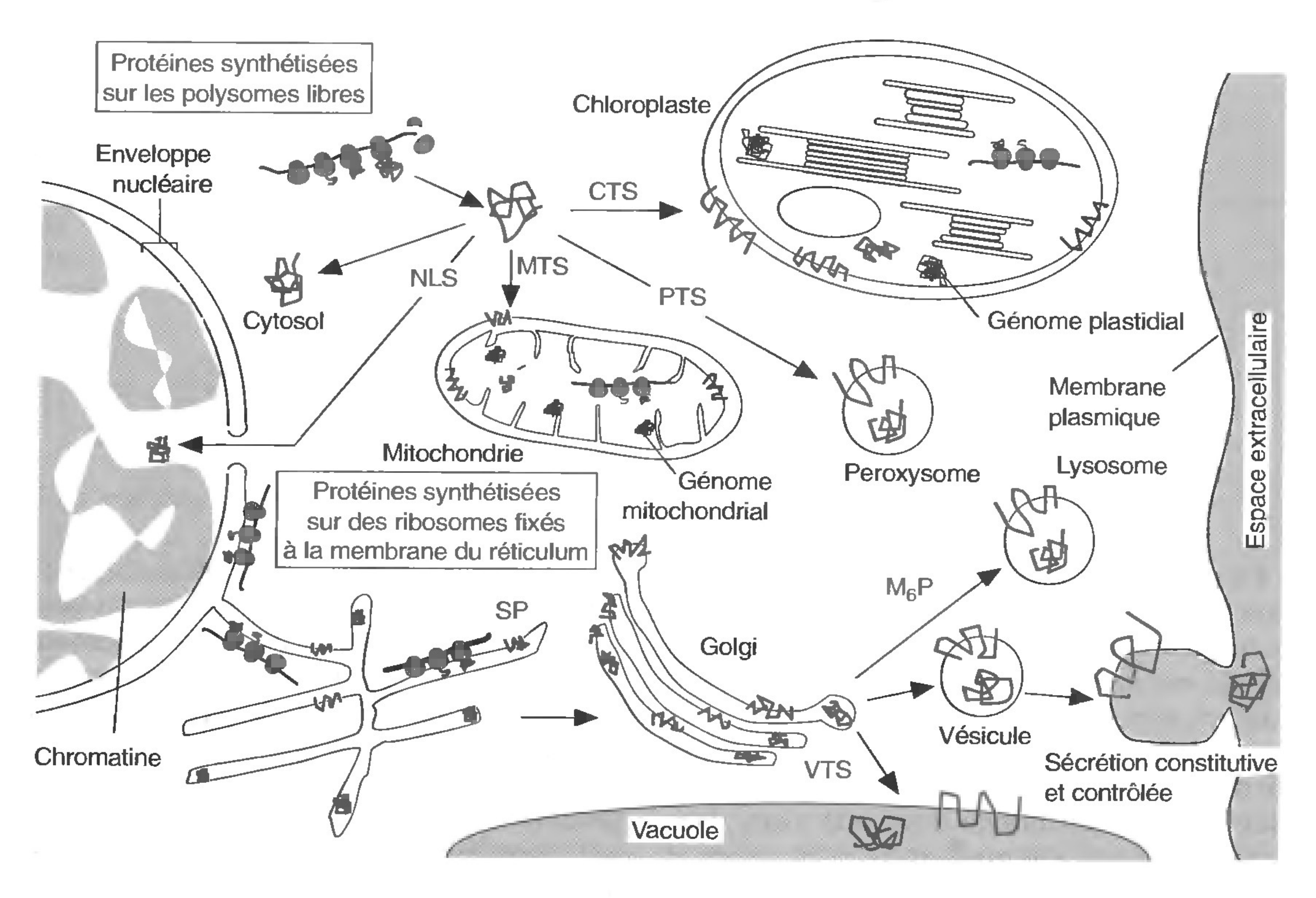


Fig. IV-21 : **Lieux de synthèse et voies de routage des protéines.**

chondrial *T*ranslocation *S*equence) et CTS (*C*hloroplast *T*ranslocation *S*equence) (voir chap. VIII, 2[e] partie). Le passage des deux membranes de ces organites fait intervenir des systèmes de translocation complexes contrôlés par des protéines chaperons.

– les *peroxysomes*, grâce à une séquence signal, le PTS (*P*eroxysome *T*ranslocation *S*equence)

2. Les protéines synthétisées sur des ribosomes fixés à la membrane du réticulum endoplasmique

L'histoire de ces protéines est différente dans la mesure où elles sont intégrées au compartiment endomembranaire par un processus d'insertion cotraductionnelle grâce à une séquence signal hydrophobe, SP (**S**ignal **P**eptide ou *P*eptide *S*ignal). Leur routage utilise la voie de l'appareil de Golgi et de nombreuses vésicules porteuses (voir chap. VII, 2[e] partie).

Les destinations principales sont les suivantes :

– la *surface cellulaire* où elles sont acheminées soit par voie constitutive (sans signal) ou contrôlée (avec signal)

– les *lysosomes* des cellules animales ou les *vacuoles* des cellules végétales grâce à des signaux, mannose-6-phosphate (M6P) pour les lysosomes, signal VTS (*V*acuolar *T*ranslocation *S*equence) pour les vacuoles.

CHAPITRE V

Quelques éléments de régulation

La cellule s'accroît et se multiplie en prélevant dans le milieu les éléments qui lui sont nécessaires. Ce milieu diffère selon que la cellule est isolée (organisme unicellulaire en contact avec le milieu extérieur) ou qu'elle appartient à un ensemble complexe (organisme pluricellulaire chez qui les cellules baignent dans un milieu intérieur) mais, dans tous les cas, cet environnement peut varier et la cellule pour se développer doit adapter les systèmes qui gouvernent son métabolisme aux nouvelles situations. De même, au cours de la vie cellulaire, et c'est le cas de cellules subissant une différenciation, des molécules nouvelles doivent être élaborées pour la construction d'un protoplasme spécialisé. En d'autres termes, la cellule doit modifier en permanence ses outils, c'est-à-dire les enzymes, et ses structures.

Toute l'information génétique n'est donc pas transcrite et traduite en permanence; certains gènes sont actifs à un moment donné, selon les exigences de l'environnement ou selon le stade de développement; ils seront inactifs à d'autres périodes. Il convient donc que l'expression de chaque gène soit quantitativement et qualitativement régulée en fonction de l'intensité des stimuli perçus par la cellule; de plus, la durée de vie des molécules produites, notamment des enzymes, doit pouvoir être contrôlée pour qu'il puisse y avoir adaptation.

Le but de ce chapitre est de comprendre, *dans leurs grandes lignes*, les mécanismes très complexes qui contrôlent ce fonctionnement. Chez les Procaryotes, ils sont relativement plus simples car l'essentiel de la régulation s'exerce au niveau des transcriptions; en effet, comme nous l'avons vu page 204, les ARN messagers sont immédiatement traduits; il y a *colinéarité gène-protéine*. Les mécanismes sont beaucoup plus difficiles à analyser chez les Eucaryotes en raison de la grande diversité des systèmes mis en place.

1. LA RÉGULATION CHEZ LES PROCARYOTES

Comme nous l'avons vu page 83, il existe souvent dans le métabolisme bactérien une régulation de l'activité d'une ou de plusieurs enzymes d'une chaîne de biosynthèse par l'un des produits terminaux. Cette rétroaction est le résultat d'une transition allostérique de la protéine enzymatique qui est organisée en structure quaternaire. Ces mécanismes sont certes efficaces et importants mais ils ne permettent pas, à eux seuls, de réaliser la nécessaire adaptation aux conditions de l'environnement. Une régulation au niveau de la

transcription intervient également. C'est chez les bactéries, et plus précisément chez *Escherichia coli*, que fut compris le premier système de contrôle ; c'est celui du métabolisme du lactose, découvert par F. JACOB et J. MONOD, ce qui valut à ces chercheurs, et A. LWOFF, le prix Nobel de médecine en 1965.

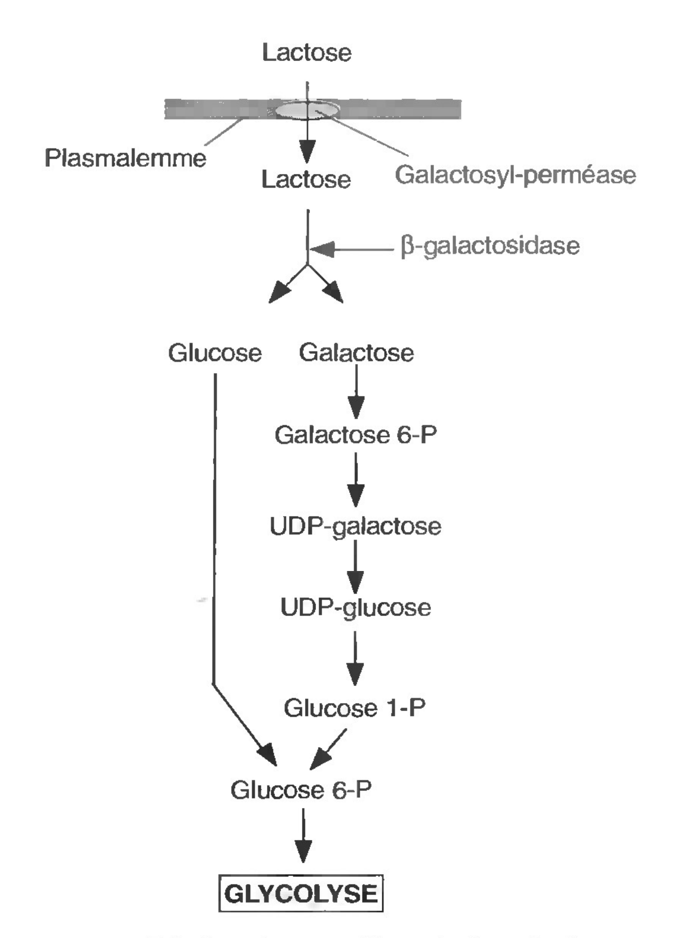


Fig. V-1 : Pénétration et dégradation du lactose dans la cellule bactérienne.

1.1. LE CONCEPT D'OPÉRON : L'OPÉRON LACTOSE

Les colibacilles, comme la plupart des bactéries, se développent sur un milieu de culture en utilisant de préférence le glucose comme source de carbone. Si cet ose vient à manquer, elles peuvent continuer à croître en utilisant un autre sucre, le lactose par exemple. Ce dioside (ou disaccharide) est formé par l'association d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose (voir p. 108). Pour être utilisé, le lactose doit donc d'abord être hydrolysé, c'est-à-dire que les deux hexoses le constituant doivent être séparés. Le glucose est alors transformé en glucose 6-phosphate qui entre dans la voie de la glycolyse (voir p. 320) ; par contre, le galactose, qui n'est pas directement métabolisable, doit d'abord être transformé en glucose 6-phosphate *(fig. V-1)*.

L'hydrolyse du lactose est réalisée par une enzyme, ***la β-galactosidase***, qui, dans une bactérie se développant sur un milieu glucosé, ne se trouve qu'en très petite quantité dans la cellule, une dizaine de molécules environ. Le transfert de cette cellule dans un environnement où la seule source de carbone est le lactose *induit la synthèse de β-galactosidase (fig. V-2)* ; la cellule en contient très rapidement plusieurs milliers de molécules ; **la β-galactosidase est une enzyme inductible**.

L'induction peut être déclenchée par des sucres autres que le lactose qui sont également des inducteurs, mais n'étant pas le substrat de l'enzyme, ne sont pas hydrolysés ; ce n'est donc pas la liaison enzyme-substrat qui est à l'origine de la stimulation de la synthèse de la β-galactosidase.

Une constatation importante, pour la compréhension du mécanisme, est que l'induction

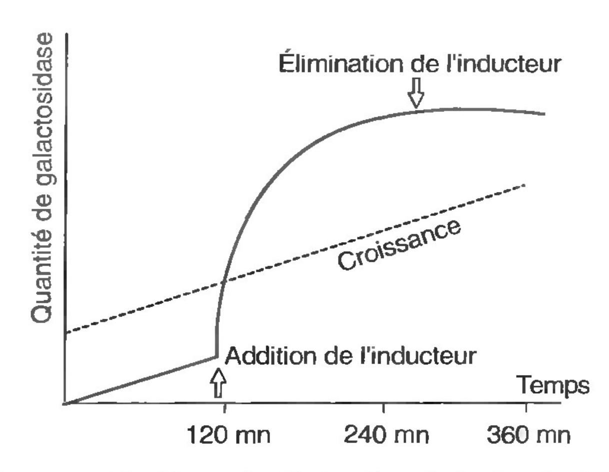


Fig. V-2 : Cinétique de l'induction de la β-galactosidase chez la bactérie *Escherichia coli*.
Dans la première partie de l'expérience, jusqu'à 120 minutes, l'augmentation de la teneur en enzyme est proportionnelle à la croissance de la culture (pointillé) ; l'addition d'un inducteur provoque un très brutal accroissement de la quantité de β-galactosidase.
(D'après D.S. HOGNESS, 1958.)

entraîne non seulement la synthèse de β-galactosidase mais aussi celle de deux autres protéines, une galactoside perméase, qui réalise le transfert du lactose au niveau du plasmalemme, et une thiogalactoside transacétylase dont le rôle physiologique n'est pas en rapport avec l'utilisation du lactose. Cette transcription simultanée des trois protéines implique que les gènes codants, qui sont *des gènes de structure ou cistrons* (c'est-à-dire des séquences codant pour des protéines), appelés *lac z* (pour la β-galactosidase), *lac y* (pour la perméase) et *lac a* (pour la transacétylase), *soient contigus*. Cette localisation est confirmée par l'étude génétique de mutations permettant d'établir une cartographie du génome concerné.

Puisque l'expression de ces trois gènes est coordonnée, elle doit être contrôlée par un autre gène qui est un **gène régulateur** *(lac i)*. Il existe donc fondamentalement deux types de gènes, *les gènes de structure*, qui codent pour des protéines enzymatiques ou de constitution, et *les gènes régulateurs*.

L'existence d'une région codant pour une protéine ayant un rôle régulateur est également démontrée par des analyses génétiques; les mutations se produisant au niveau de ce gène modifient en effet le comportement des cellules qui synthétisent alors de manière continue, *même en l'absence d'inducteur*, les protéines codées par *lac z*, *lac y* et *lac a*; la protéine produite à partir de l'information située au niveau de *lac i* interdit donc la transcription des autres gènes, c'est un ***répresseur***.

Ce répresseur doit, pour bloquer la transcription, se lier à l'ADN en amont du gène au niveau d'une région particulière qui constitue **l'opérateur**; celui-ci, localisé entre le *promoteur* – zone où se fixent l'ARN polymérase et le facteur sigma – et le premier gène de structure, perturbe et bloque la progression du complexe enzymatique.

JACOB et MONOD ont proposé, pour ce système modèle de régulation de synthèse protéique, le nom d'***opéron***. Un opéron est constitué par au moins trois éléments *(fig. V-3, A)*: un gène régulateur, une zone de contrôle constituée par le promoteur et l'opérateur, les gènes de structure (trois dans le cas de l'opéron lactose).

Le mécanisme de la régulation est fondé sur la synthèse d'une protéine, le répresseur, qui en se fixant sur l'opérateur empêche la progression de l'ARN polymérase *(fig. V-3, B)*; *ce répresseur est synthétisé en petite quantité de manière permanente*. Le lactose et les autres inducteurs présentent une grande affinité pour le répresseur; ils se fixent à lui et cette liaison modifie la forme de la protéine

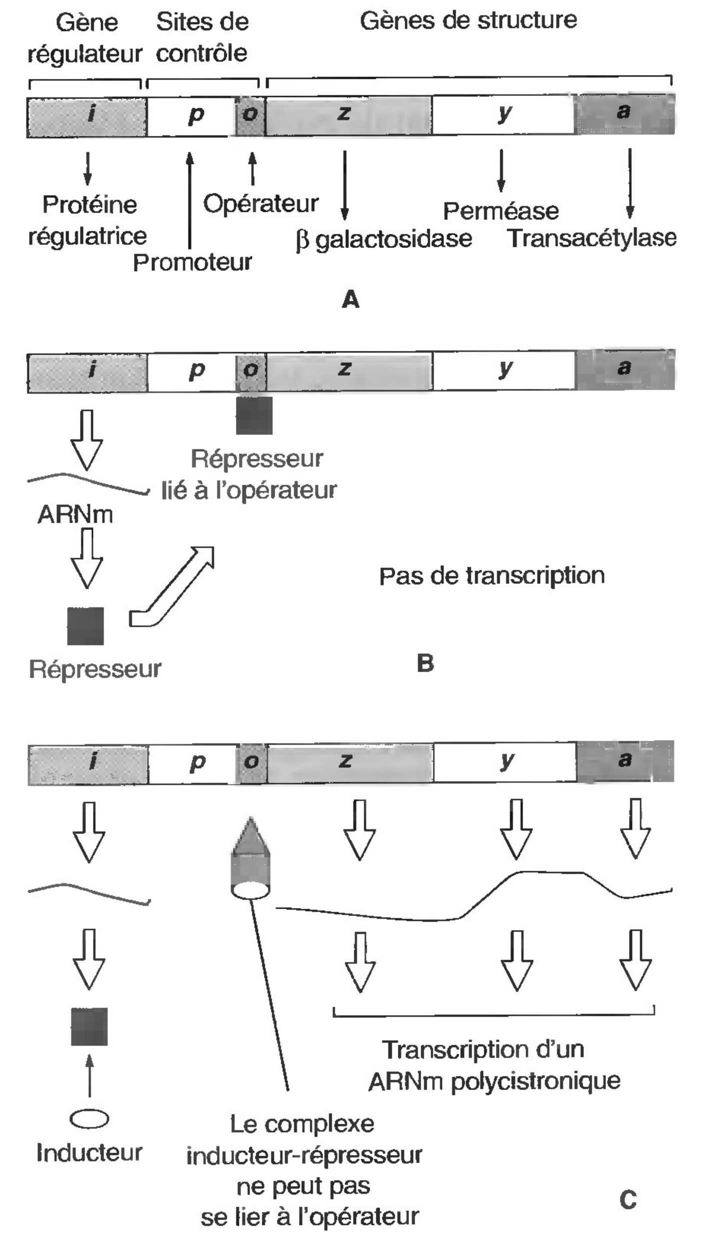


Fig. V-3: L'opéron lactose.
A) Organisation de l'opéron.
B) Liaison du répresseur et blocage de la transcription.
C) Induction par formation du complexe inducteur-répresseur.

(fig. V-3, C) ; celle-ci ne peut plus alors s'associer à l'opérateur ; en conséquence, la polymérase peut transcrire les gènes de structure sous forme d'un prémessager unique, c'est un *transcrit polygénique* ou *polycistronique* (p. 238).

Cette régulation est toutefois affectée par la teneur en glucose du milieu de culture : si cet hexose est présent, il n'y a pas d'augmentation de synthèse de β-galactosidase par l'inducteur. Ceci tient au fait que la liaison du complexe (facteur σ-ARN polymérase) à l'ADN n'est possible que si un autre complexe, constitué par l'AMP cyclique et une protéine particulière appelée CAP *(catabolic activator protein)*, est fixé en 5' du promoteur. Or chez les Procaryotes, l'AMP cyclique est produit lorsque le milieu est dépourvu de glucose. La synthèse de β-galactosidase est ainsi doublement contrôlée ; sa production ne peut être mise en œuvre que si les conditions de vie dans le milieu la rendent indispensable.

1.2. LES DIFFÉRENTES MODALITÉS DE LA RÉGULATION CHEZ LES BACTÉRIES

La régulation chez les bactéries est donc fondée sur la présence de gènes constitutifs, les gènes régulateurs, qui sont transcrits de manière permanente. Ils sont plus ou moins nettement séparés des gènes de structure qu'ils contrôlent et synthétisent une protéine régulatrice qui, en se liant à l'ADN au niveau de l'opérateur, empêche la progression du complexe de transcription. À partir de ce mécanisme de base, deux modalités sont rencontrées, le contrôle négatif et le contrôle positif.

A. Le contrôle négatif

C'est celui de l'opéron lactose. L'induction de la synthèse de β-galactosidase est réalisée lorsque le lactose, ou plus exactement une forme moléculaire légèrement différente, *l'allo-lactose*, se lie au répresseur. Pour que l'induction démarre, il est donc nécessaire qu'il y ait dans le cytoplasme quelques molécules de lactose ; en d'autres termes, le sucre qui a été introduit dans le milieu extérieur doit avoir, au moins partiellement, pénétré dans la cellule. Ceci est possible car il existe toujours quelques molécules de perméase et de β-galactosidase dans la cellule, même lorsqu'elle est cultivée dans un milieu totalement dépourvu de lactose. Cette faible quantité d'enzymes permet d'abord la pénétration du lactose, puis sa transformation en allo-lactose ; celui-ci s'associe aux quelques molécules de répresseur (liées ou non à l'opérateur) ; la transcription peut alors débuter. En quelques minutes la cellule contient des milliers de molécules de perméase et de β-galactosidase.

Lorsque dans le milieu la concentration en lactose chute, la teneur en allo-lactose cellulaire baisse, les molécules de répresseur sont libérées ; l'opéron lactose est à nouveau bloqué.

Le contrôle est négatif car *la liaison de la protéine régulatrice à l'opérateur interdit la transcription.*

B. Le contrôle positif ; exemple de l'opéron arabinose

En l'absence du glucose, les bactéries peuvent utiliser, outre le lactose, d'autres sucres dont un pentose, l'arabinose.

L'utilisation de ce sucre implique sa transformation préalable en xylulose, un autre pentose, ce qui nécessite l'intervention de trois enzymes : une isomérase, une kinase, une épimérase *(fig. V-4)*. Ces enzymes sont codées par trois gènes contigus, respectivement *ara B*, *ara A* et *ara D* *(fig. V-5, A)* dont la transcription forme un ARNm polycistronique. Cet opéron arabinose est complété par un promoteur (PRO) et deux sites opérateurs (Op 1 et Op 2) ; une protéine régulatrice, C, est codée par un gène régulateur, *ara C*, situé en amont des sites opérateurs, Op 1 et Op 2. Comme pour l'opéron lactose, la transcription de l'ARNm n'est possible que si le glucose est absent du milieu ; c'est-à-dire si l'AMP

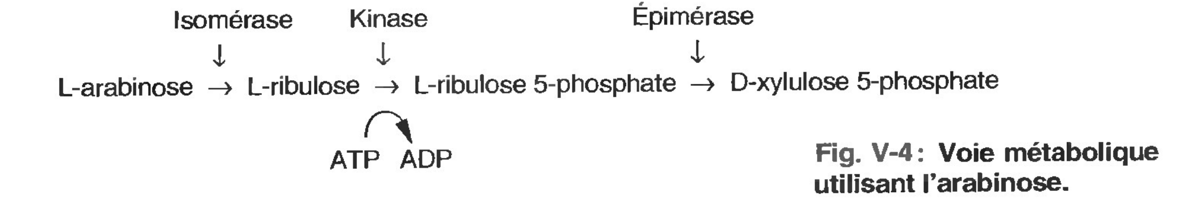


Fig. V-4 : Voie métabolique utilisant l'arabinose.

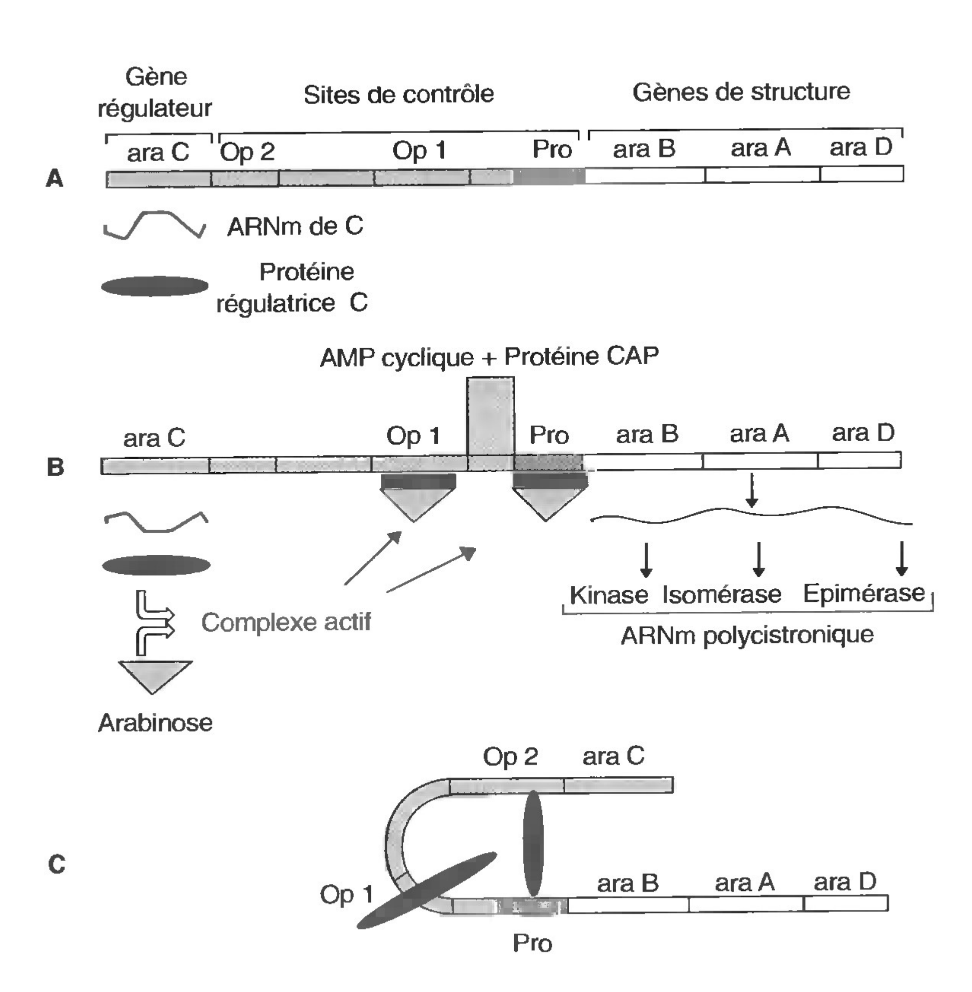


Fig. V-5 : L'opéron arabinose.
A) Organisation de l'opéron.
B) Transcription en présence d'arabinose.
C) Inhibition en l'absence d'arabinose.

cyclique et la protéine CAP sont liées au promoteur. L'arabinose présent se lie alors à la protéine C, dont il modifie la conformation ; les complexes ainsi formés s'associent au promoteur d'une part, au site régulateur 1 d'autre part *(fig. V-5, B)*. Ces deux complexes et celui formé par l'AMP cyclique et la protéine CAP autorisent la fixation de la polymérase ; la transcription commence et l'ARNm polycistronique est produit. *Le contrôle est positif puisque c'est la liaison de l'arabinose à la protéine régulatrice C qui* ***permet, après liaison du complexe à l'opérateur et au promoteur, la synthèse*** *du messager**.

Quand l'arabinose est absent, la protéine C se lie au promoteur et au site régulateur 2 et cette double liaison courbe l'ADN, interdisant la fixation de la polymérase *(fig. V-5, C)*.

C. *Le contrôle négatif atténué : l'opéron tryptophane*

La synthèse des acides aminés est également l'objet d'une régulation puisqu'elle ne doit intervenir qu'en cas de besoin, quand la molécule n'est pas présente dans la cellule.

* Le système est plus complexe du fait que, selon la teneur en AMP cyclique et en protéine CAP, cette liaison modifie le niveau de transcription de la protéine C elle-même.

Le tryptophane est un acide aminé aromatique dont la synthèse, ayant pour point de départ le phosphoénolpyruvate et l'érythrose phosphate *(fig. V-6)*, fait intervenir plusieurs produits intermédiaires, dont le chorismate. La transformation de celui-ci en tryptophane nécessite l'intervention de trois enzymes. Ces dernières sont obtenues à partir d'un ARNm polycistronique dont *la traduction commence, comme toujours chez les Procaryotes* (voir p. 204), *avant la fin de la transcription* et qui est très rapidement dégradé. Les gènes codant pour ces enzymes sont réunis au sein d'un opéron dans lequel les sites promoteur (P) et opérateur (O) se chevauchent *(fig. V-7)*.

La transcription de cet opéron est régulée par une protéine qui, en raison de sa conformation, ne peut pas se lier à l'opérateur; c'est seulement lorsqu'elle est associée à une molécule de tryptophane qu'elle le peut; c'est une nouvelle fois **une stéréospécificité induite.** Le complexe, protéine régulatrice-tryptophane, s'associe à l'opérateur; chevauchant le promoteur, il interdit la fixation de l'ARN polymérase. *C'est un processus régulateur négatif.* Le tryptophane agit ici comme un *co-répresseur*; la synthèse est donc directement régulée par la teneur de la cellule en cet acide aminé: s'il est présent, pas de transcription; s'il est absent, transcription.

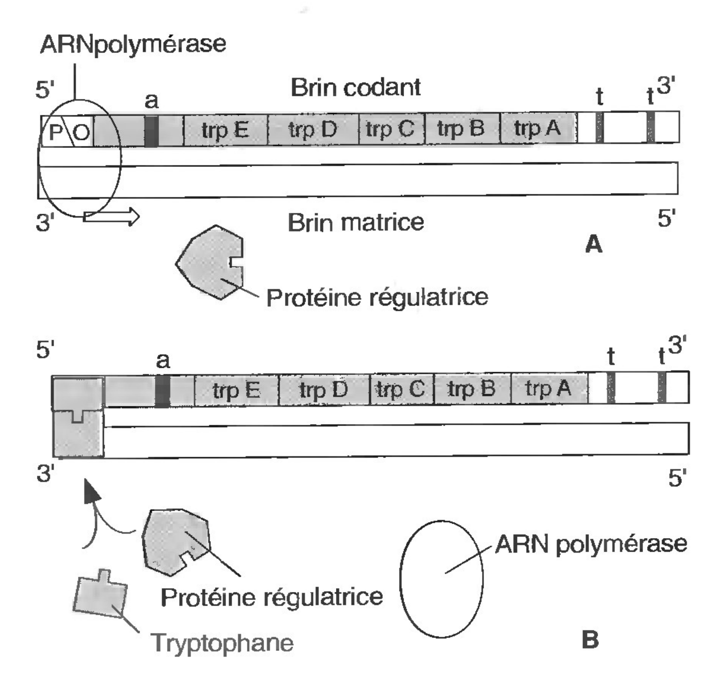


Fig.V-7 : Organisation de l'opéron tryptophane.
La protéine régulatrice, lorsqu'elle est seule, ne se fixe pas au promoteur (A); par contre, en présence de tryptophane (B), elle forme, avec celui-ci, un complexe qui peut interdire l'association de l'enzyme de transcription et de l'ADN.

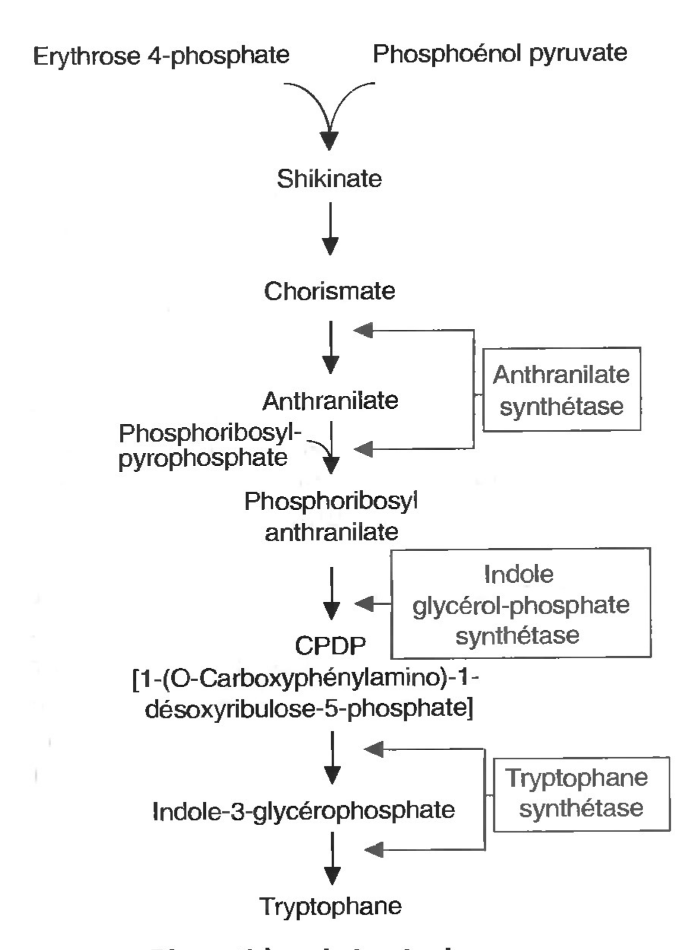


Fig. V-6 : Biosynthèse du tryptophane.

L'originalité de cet opéron tient à deux particularités : 1) entre l'ensemble promoteur-opérateur et le premier gène de structure, il existe une autre séquence appelée **atténuateur**, dont une partie est transcrite ; 2) la séquence codant pour la protéine régulatrice n'est pas située à proximité de l'opéron; elle en est éloignée et on ignore exactement à quelle distance elle est située; *gène régulateur et opéron ne sont donc pas obligatoirement liés.*

L'analyse de l'atténuateur montre une séquence nucléotidique particulière; celle-ci, transcrite, conduit à l'élaboration d'un ARNm *(fig.V-8, A)* au début duquel on peut identifier quatre régions différentes : 1, 2, 3 et 4. Les nucléotides constituant ces quatre segments

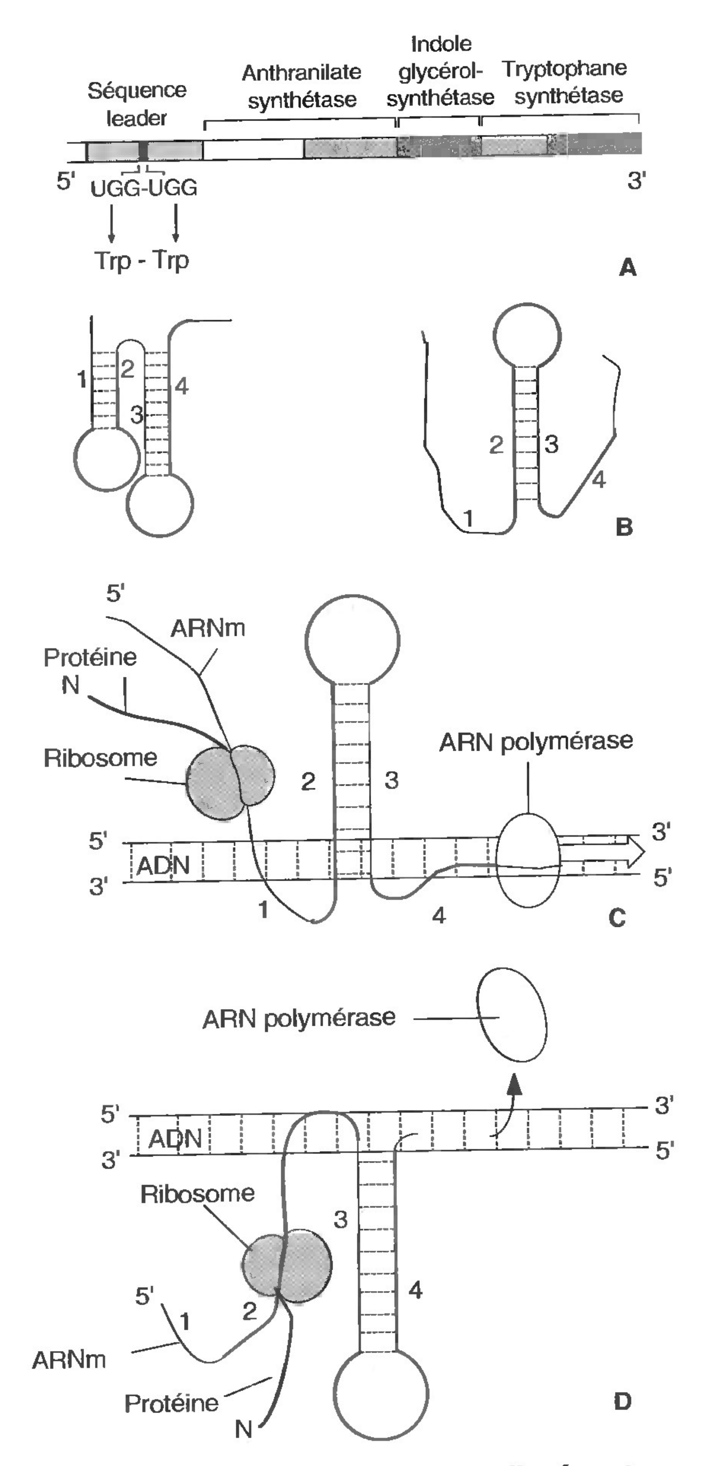


Fig. V-8: Le système atténuateur de l'opéron tryptophane.

sont disposés dans un ordre tel qu'il est possible d'obtenir deux sortes d'appariements entre bases complémentaires *(fig. V-8, B)*; il y a ainsi possibilité de former deux boucles (appariement 1-2 et 3-4) ou une seule (appariement 2-3).

Dès que la transcription a débuté, un ribosome s'accroche à l'extrémité 5' de l'ARNm et commence la traduction de la région incluant l'atténuateur, qualifiée de leader (L). Comme toujours chez les procaryotes, la progression du ribosome suit *de très près celle de l'ARN polymérase*. Or dans cette région, se trouvent deux codons UGG correspondant au tryptophane; deux cas peuvent alors se présenter.

– *Le tryptophane est absent du milieu* et le ribosome est stoppé dans sa progression au niveau du segment 1 puisqu'il n'y a pas d'aminoacyl-ARNt correspondant au codon UGG; l'ARN polymérase par contre poursuit sa progression, transcrit successivement les segments 2, 3 puis 4. La position du ribosome *(fig. V-8, C)* interdit l'appariement 1-2; celui qui se réalise intéresse les segments 2-3; il y a constitution d'une structure secondaire en boucle mais elle ne gêne pas l'avance de la polymérase qui lit le segment 4 puis les gènes de structure qui suivent.

– *Le tryptophane est présent* et le ribosome poursuit la traduction derrière la polymérase; le segment 2 est en cours de lecture lorsque s'achève la transcription du segment 3; en conséquence, il n'y a pas d'appariement 2-3 possible, mais une boucle peut se former par association du segment 3 au 4 dès que ce dernier est transcrit. Une boucle de ce type, ainsi placée, correspond à un signe de terminaison pour l'ARN polymérase (voir p. 203); la transcription est interrompue *(fig. V-8, D)*.

Ce mécanisme particulier permet d'affiner considérablement la régulation de la synthèse de l'ARNm polycistronique. En effet, lorsque la concentration en tryptophane est faible, mais pas nulle, certaines transcriptions sont bloquées prématurément alors que d'autres se poursuivent normalement. Il s'agit donc d'un processus extrêmement sensible qui permet de maintenir la concentration cellulaire en tryptophane à un niveau constant. De nombreux gènes, codant d'autres acides aminés, sont ainsi régulés.

2. LA RÉGULATION CHEZ LES EUCARYOTES

La mise en place d'une compartimentation *séparant le site de stockage de l'information génétique (le noyau) de son lieu d'expression (le cytoplasme)* a considérablement augmenté les possibilités de régulation génique chez les Eucaryotes. La quantité d'informations que contiennent leurs cellules est en effet telle que les mécanismes mis en place chez les bactéries n'auraient pas une efficacité suffisante ; le temps de recherche des sites régulateurs seraient trop longs et les risques de confusion importants si les signes d'identification étaient aussi courts que ceux des opérons. Cette information est en outre compactée et la - transcription nécessite une décondensation préalable.

Chez les Eucaryotes, les systèmes de régulation sont donc plus nombreux, plus précis et surtout successifs ; ils peuvent se situer à différents niveaux et être dépendants les uns des autres ; *la disposition est dite arborescente*, ce qui permet de mieux moduler les réponses. En effet, une intervention à un niveau élevé (le stockage de l'information par exemple) déclenche une série de régulations qui vont elles-mêmes en mettre d'autres en œuvre ; le nombre de réactions intéressées sera considérable et la réponse étendue. Si au contraire l'intervention se place à un niveau plus basal (la traduction par exemple), une seule réaction pourra être concernée et la réponse sélective. Les principaux niveaux de régulation sont chromatiniens, transcriptionnels, post-trancriptionnels, traductionnels et post-traductionnels.

2.1. LA RÉGULATION AU NIVEAU DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE

Elle présente plusieurs aspects.

A. Les gènes actifs

L'utilisation de DNase I très peu concentrée sur des noyaux intacts montre qu'il y a différents niveaux de sensibilité à l'action de l'enzyme ; *seules sont en effet détruites les séquences d'ADN qui sont transcrites ou qui ont été transcrites par la cellule.* Cette expérience montre qu'il existe dans le noyau des gènes qui sont accessibles aux enzymes (DNase I mais aussi probablement l'ARN polymérase) et d'autres qui sont protégés ; c'est vraisemblablement *le premier niveau de différenciation cellulaire.* Il est probable qu'au niveau de ces deux types de gènes la conformation de l'ADN est différente et que la transition d'une forme à l'autre se situe en *des points définis* qui pourraient correspondre aux sites de liaison du nucléofilament au nucléosquelette interne (voir p. 188) ; la région située entre deux points d'attache correspondrait alors à un domaine fonctionnel dont l'organisation moléculaire peut être modifiée.

L'activation et l'inactivation sont régulées au niveau moléculaire et on suppose que la cellule peut utiliser plusieurs modes de contrôle :

1) *Le surenroulement* peut rendre plus aisément accessibles les bases de l'ADN, facilitant donc le positionnement des protéines de transcription ; il résulte de l'intervention de topo-isomérases (voir p. 166) qui peuvent ainsi jouer un rôle régulateur.

2) *La structure de l'ADN* peut varier (voir p. 126 les formes B, Z) et on pense que des modifications locales, notamment l'intercalation de segments sous forme Z, facilitent le positionnement de certaines protéines et ainsi activent la transcription.

3) *La méthylation des cytosines* est une modification chimique qui se produit au niveau des séquences C-G immédiatement après la duplication. La présence de groupements méthyle réduit l'activité transcriptionnelle et peut donc constituer un des moyens de contrôle utilisé par la cellule. En règle générale d'ailleurs, l'ADN d'origine maternelle est plus fortement méthylé que celui d'origine paternelle, ce qui constitue peut-être un signal d'identification.

B. La réorganisation de l'information génétique

Des modifications plus importantes peuvent également intervenir au niveau de l'organisation de l'information génétique elle-même. Le plus classique des exemples est celui de la différenciation des anticorps.

Rappelons que les anticorps, ou immunoglobulines (voir p. 84), sont des protéines formées par l'association de quatre polypeptides, deux chaînes légères (L) et deux chaînes lourdes (H). Chacun de ces polypeptides est constitué de deux régions principales, la région variable située en position N-terminale, et la région constante occupant la position C-terminale ; les premières possèdent des séquences d'acides aminés très différentes d'un anticorps à l'autre mais les secondes sont moins sujettes à variation ; ce sont elles qui permettent d'ailleurs d'identifier les principales classes d'immunoglobulines*. *Le site actif de l'anticorps étant constitué par l'association du domaine variable d'une chaîne lourde et de celui d'une chaîne légère, le* ***nombre de combinaisons possibles est considérable****, au moins un million.*

Un lymphocyte B donné produit un seul type d'anticorps, c'est-à-dire une chaîne légère spécifique associée à une chaîne lourde spécifique. Le problème est donc celui de la production de ces molécules hautement spécialisées dans la reconnaissance d'un épitope.

Chaque chaîne, lourde ou légère, est synthétisée à partir d'un ARNm codant pour les régions variable et constante, ce qui indique qu'il existe dans chaque lymphocyte B différencié *un gène portant l'information nécessaire à la constitution des deux domaines des immunoglobulines*. Comment dès lors la diversité peut-elle s'instaurer ?

Si on prend comme exemple une chaîne légère, il existe, dans les ***lymphocytes B immatures***, de nombreuses séquences codant le domaine variable (unités V), plus de 300 chez l'homme, qualifiées de « gènes multiples », et quelques séquences (environ 7) pour le domaine constant (unités C). *Au cours de la différenciation, le gène responsable de la synthèse d'une chaîne L est édifié par association de n'importe laquelle des unités V avec l'une des unités C*, l'ADN étant épissé suivant le même principe que l'ARNm (voir p. 222). Ce processus appelé ***recombinaison somatique*** est à l'origine de la diversité des anticorps (l'association de deux unités choisies parmi les 300 V de la chaîne L et les 300 V de la chaîne H autorise à elle seule 9.10^4 combinaisons).

Sur le chromosome portant l'information nécessaire à l'édification de la chaîne légère *(fig. V-9)*, on rencontre les nombreuses unités V associées chacune à une courte séquence leader, puis, beaucoup plus loin sur le chromosome, les unités C ; celles-ci sont précédées par une région où se situent des unités J (J pour jonction) dont le nombre varie selon la chaîne polypeptidique de l'anticorps. Les unités V et C, *qui sont donc éloignées sur l'ADN des cellules souches ou des cellules embryonnaires*, sont par contre étroitement associées par l'intermédiaire d'une unité J sur le chromosome de la cellule produisant l'anticorps ; il y a eu *translocation* au cours de la différenciation.

On conçoit donc que le nombre de gènes pouvant être constitués à partir des unités V, J et C soit très grand, d'autant plus grand que la partie variable de la chaîne d'immunoglobuline (108 acides aminés) est codée par l'unité V (95 acides aminés) et une partie de l'unité J (environ 13 acides aminés), ce qui correspond à une double source de variabilité (V et J). Celle-ci est encore accrue par le fait que *la jonction V-J n'est pas strictement déterminée* ; à partir des deux mêmes unités V et J plusieurs modes de liaisons sont possibles *(fig. V-10)* ce qui introduit de nouvelles associations en codons.

La diversité est encore plus importante pour les régions variables des chaînes lourdes car il s'intercale entre les unités V (quelques centaines) et les unités C (5) *des séquences codant pour un segment supplémentaire*, D (il en existe 15 différents). Les associations V-D-J-C codant les ARNm des chaînes lourdes offrent donc une plus grande variabilité que les groupements V-J-C à l'origine des chaînes légères.

* Rappelons qu'à partir des régions constantes des chaînes lourdes, on distingue cinq classes d'immunoglobulines : IgA, IgG, IgM, IgD, IgE.

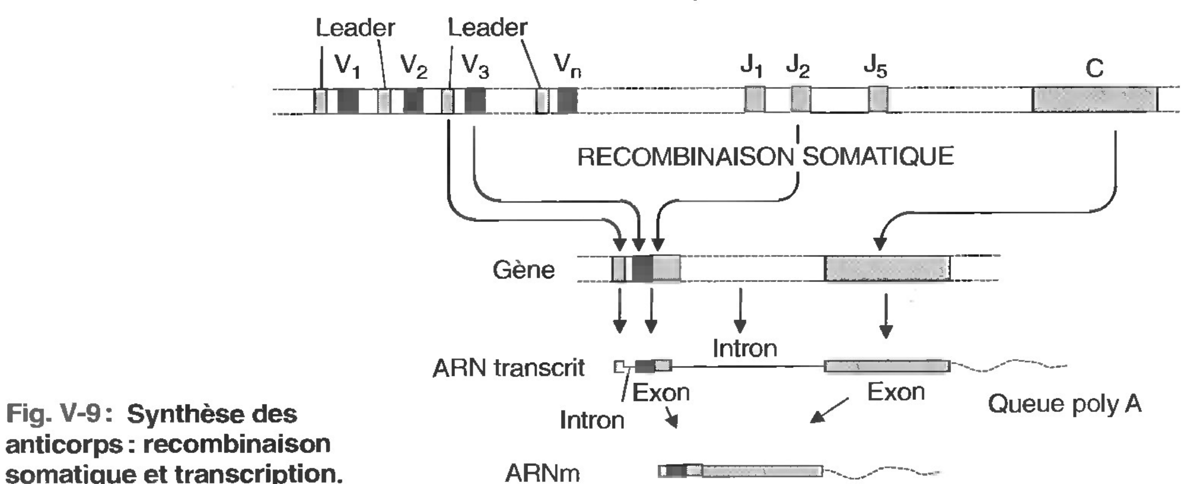


Fig. V-9 : Synthèse des anticorps : recombinaison somatique et transcription.

À partir du gène ainsi formé, le transcrit primaire est élaboré ; il possède une queue poly (A) et des séquences non traduites aux extrémités 5' et 3'. De plus il contient des introns. Une séquence signal à l'extrémité N-terminale du polypeptide permet le transfert dans les cavités du réticulum endoplasmique.

Les mécanismes mis en œuvre pour construire un gène original, spécifique de chaque lymphocyte mature, permettent d'envisager la constitution de $1{,}7.10^8$ anticorps différents.

Chaque lymphocyte B possède à sa surface, insérés dans le plasmalemme, *des récepteurs dont la région variable est spécifique* ; ces récepteurs sont codés à partir de l'information mise en place par la recombinaison somatique ; *ce sont des molécules d'immunoglobulines ayant traversé le plasmalemme* car elles possèdent une séquence supplémentaire hydrophobe autorisant leur insertion dans la membrane. Lorsqu'un antigène se lie à ce récepteur par **stéréocomplémentarité**, il y a activation des lymphocytes. Certains de ceux-ci se multiplient rapidement, se différencient ; ils deviennent des *plasmocytes* spécialisés dans la synthèse et la sécrétion des anticorps solubles. D'autres seront des *cellules B* ayant acquis une mémoire de longue durée ; ils pourront être très rapidement activés pour se différencier en plasmocytes augmentant ainsi la promptitude de la réponse immunitaire. La constitution d'une population importante de cellules identiques provenant toutes d'une même cellule initiale, ce que l'on appelle *un clone*, permet d'expliquer l'importance de la réponse que peut présenter un organisme tout en maintenant le nombre des lymphocytes B de chaque type en nombre réduit : ***c'est la théorie de la sélection clonale***.

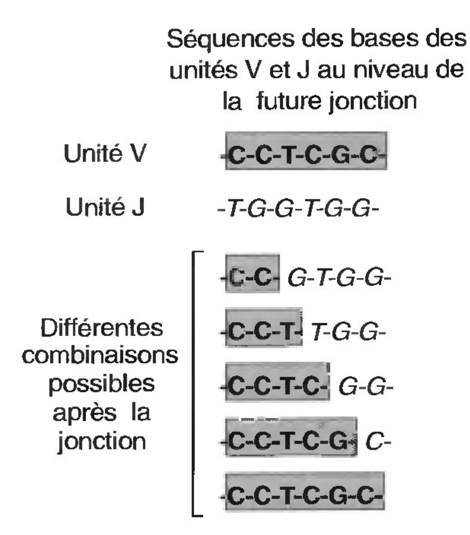


Fig. V-10 : Variations possibles de la séquence du gène recombiné au niveau de la jonction des unités V et J.

2.2. RÉGULATION AU NIVEAU DE LA TRANSCRIPTION

C'est le mode de régulation qui correspond le mieux à ce que nous avons étudié au niveau des opérons bactériens ; les mécanismes observés sont toutefois beaucoup plus nombreux et complexes ; leur étude est en cours et de nom-

breux points sont encore sujets à des interprétations diverses.

Nous avons vu que les unités de transcription de l'ARNr étaient disposées en tandem (p. 212) et séparées les unes des autres par des régions non transcrites, *les espaceurs (fig. V-11, A)*. Dans certains cas cependant, des transcriptions sont observées à ce niveau *(fig. V-11, B)*; les synthèses y sont réalisées *à partir de l'information codée par le brin qui sert également pour l'édification de l'ARNr 45S* puisque le sens d'élongation des transcrits est identique.

Ces unités intercalaires sont également transcrites par l'ARN polymérase I; elles codent des éléments régulateurs dont les cibles sont les promoteurs des ARNr 45S *(fig. V-12)*; ils stimuleraient les synthèses. Les modalités de leur intervention ne sont toutefois pas encore très bien comprises.

Ce sont les régulations de transcription des ARNm qui ont été les plus étudiées; en conséquence, ce sont elles qui seront développées dans les pages qui suivent.

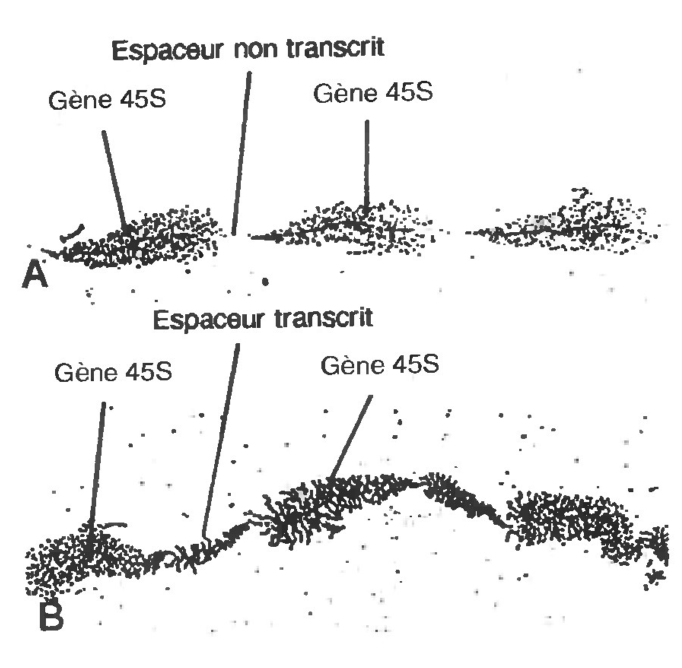


Fig. V-11 : Étalements moléculaires de gènes ribosomaux d'ovocytes de grenouille.
A) Cas le plus commun, l'espaceur n'est pas transcrit.
B) Cas plus exceptionnel où l'espaceur est transcrit.
(D'après des documents de G. MORGAN et A.H. BAKKEN.)

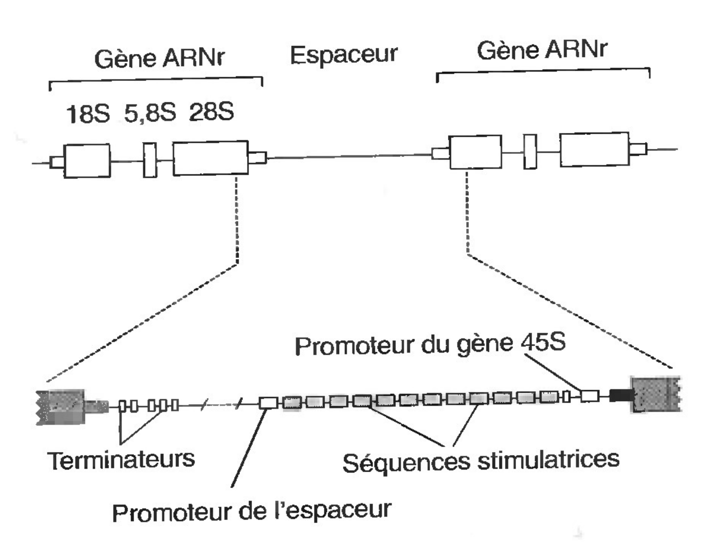


Fig. V-12 : Organisation de l'espaceur chez la souris.
Cette organisation est relativement simple chez la souris; elle peut être plus complexe, comme c'est le cas chez la grenouille lorsqu'il y a plusieurs promoteurs.

A. Les sites régulateurs

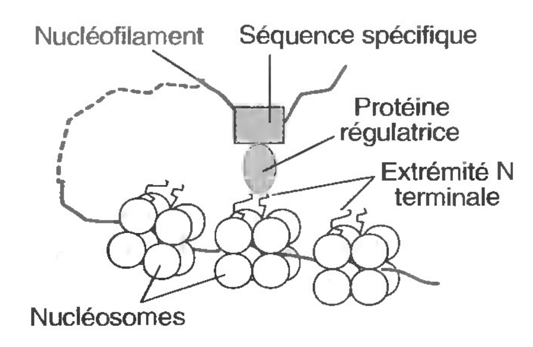
La transcription des ARNm peut être contrôlée à plusieurs niveaux que l'on peut très schématiquement réduire à trois.

a. Régulation par les histones

Chez les levures, l'inhibition de la synthèse des histones se traduit par une nette augmentation des transcriptions d'ARNm d'autres protéines, ce qui laisse supposer que les histones ont un rôle régulateur, inhibiteur.

Ce mécanisme de répression est particulièrement efficace puisqu'il consiste à incorporer la boîte TATA dans un nucléosome, la rendant ainsi inaccessible aux facteurs de transcription et à l'ARN polymérase II. Ce mode de répression est en outre renforcé par la mise en place de niveaux d'organisation supérieurs comme la fibre de 30 nm. Inversement, la fixation du facteur TF II D (voir p. 207) sur une boîte TATA accessible interdit l'assemblage des nucléosomes et rend inefficace cette modalité de répression.

On a cependant constaté chez la levure que tous les gènes ne sont pas réprimés par l'intermédiaire des histones; *ce sont ceux qui sont transcrits en permanence*, codant de nombreuses fonctions cellulaires (teneur en oses



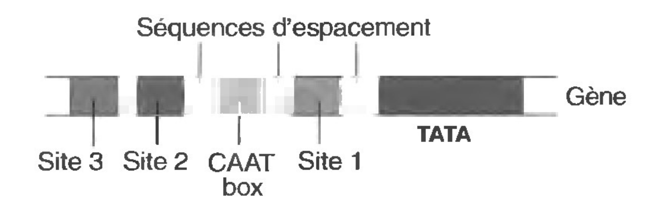


Fig. V-14 : Séquences régulatrices voisines d'un promoteur.

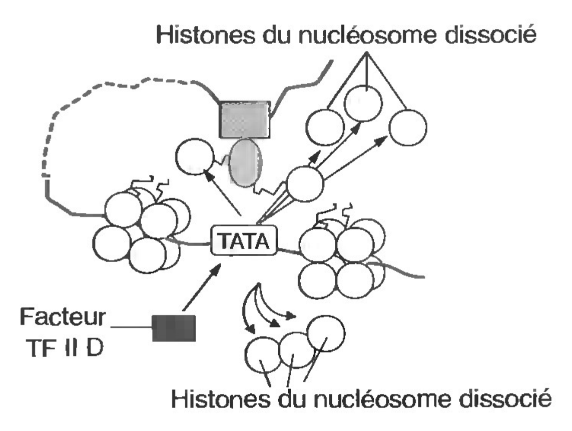


Fig. V-13 : Désorganisation d'un nucléosome par une protéine activatrice et démasquage d'une boîte TATA.

ou en acides aminés par exemple). Par contre, *ceux qui sont inductibles*, dont le fonctionnement dépend d'un stimulus particulier, interne ou externe, *sont inhibés par les histones*.

Cette inhibition peut être contrôlée par les protéines activatrices d'un gène qui s'associent à une séquence particulière d'ADN selon un mécanisme étudié plus loin (voir p. 258). Se liant alors à l'extrémité N-terminale d'une histone (H_3 ou H_4), cette protéine régulatrice modifie la conformation de l'histone ce qui la rend incapable de conserver les contacts établis avec les autres histones ; le nucléosome est alors désorganisé *(fig. V-13)*.

b. Les séquences régulatrices contiguës au promoteur

Ces séquences, *situées immédiatement en amont du gène*, qualifiées de *cis*-régulatrices, peuvent être plus ou moins nombreuses et séparées les unes des autres par des séquences intercalaires *(fig. V-14)*. Elles s'ajoutent aux boîtes CAAT et CG (voir p. 206) et correspondent à des sites de fixation de dimères protéiques symétriques (voir ci-dessous) qui sont les facteurs *trans*. *Ceux-ci peuvent avoir un mode de régulation positif ou négatif* ; ils interviendraient par l'intermédiaire du facteur TF II D, stimulant ou bloquant la constitution du complexe de préinitiation. Par leur intermédiaire, la cellule peut répondre à des stimuli extra et intracellulaires.

c. Les séquences régulatrices éloignées du promoteur

Ce sont surtout *des séquences activatrices*, ou stimulatrices, des amplificateurs *(enhancers)*, qui augmentent considérablement le taux de transcription du gène auquel elles sont associées ; certaines ont toutefois été caractérisées dont l'effet est réducteur *(silencer)*. *Elles peuvent être éloignées de plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de bases du gène qu'elles contrôlent.* Cet éloignement traduit sans doute une certaine indépendance fonctionnelle, ces régions régulatrices pouvant intervenir au niveau de plusieurs gènes différents.

Elles sont formées par plusieurs dizaines de paires de bases réparties généralement en 5 ou 6 sous-séquences de 6 à 10 pb chacune.

Ces séquences sont des sites de fixation de protéines régulatrices et on considère généralement qu'*un gène particulier ne peut être notablement exprimé que lorsqu'elles sont toutes occupées par leur protéine spécifique.*

Étant donné l'éloignement de ces séquences, leur intervention au niveau du complexe d'initiation ne peut être comprise que si la région du nucléofilament qui les porte est rapprochée de celle où se situe le promoteur *(fig. V-15)*.

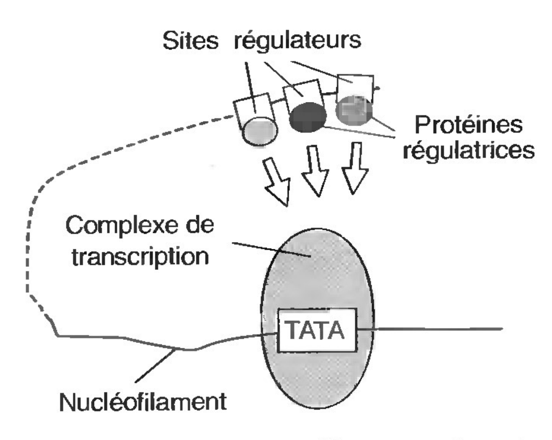


Fig. V-15 : Mode possible d'intervention de protéines régulatrices liées à des séquences éloignées du promoteur.

B. *Les facteurs régulateurs, facteurs* trans

Ils correspondent aux molécules qui s'associent aux séquences régulatrices et sont responsables des modifications observées.

Elles possèdent au moins deux domaines différents, celui qui assure la fixation à l'ADN et celui qui assure l'activation du complexe de transcription. Certaines, celles dont l'efficacité dépend d'une intervention extérieure, en possèdent un troisième, le domaine récepteur du signal.

a. Domaine d'intervention sur la transcription

Ce domaine n'est pas très variable. On a détecté quelques motifs, trois types principaux, qui en s'associant au complexe d'initiation en modifient le comportement. Ce sont des séquences particulières d'acides aminés : zones riches en glutamines, en acides aminés acides ou en proline.

b. Domaine de liaison à l'ADN

Il est à peine plus varié que le précédent puisqu'on distingue actuellement quatre principaux types de structures susceptibles de s'associer à l'ADN en des points définis. Ce sont d'ailleurs des structures comparables qui permettent la liaison des facteurs de régulation chez les Procaryotes et celle des facteurs du complexe de préinitiation des Eucaryotes.

– ***Le motif hélice-tour-hélice*** est constitué par deux hélices α reliées par un coude de quelques acides aminés *(fig. V-16)*. Une hélice s'associe aux bases de l'ADN au niveau du grand sillon, l'autre au squelette polydésoxyribose-phosphate. Ce motif se rencontre notamment chez les protéines régulatrices du développement des organismes dont il constitue une région très conservée, l'*homéodomaine*. C'est également ce motif qui assure la liaison du répresseur de nombreux opérons bactériens (dont l'opéron lactose).

– ***Le motif en doigt de gant*** constitué par une vingtaine d'acides aminés. Cette disposition très particulière est maintenue par des cystéines, ou des cystéines et des histidines, associées par un atome de zinc *(fig. V-17)*. On le rencontre chez les récepteurs nucléaires d'hormones (voir p. 261).

– ***Le motif hélice-boucle-hélice*** correspond à des structures dimériques où chaque unité (l'oligomère) est constituée par trois hélices α *(fig. V-18)* : la première (1), riche en acides

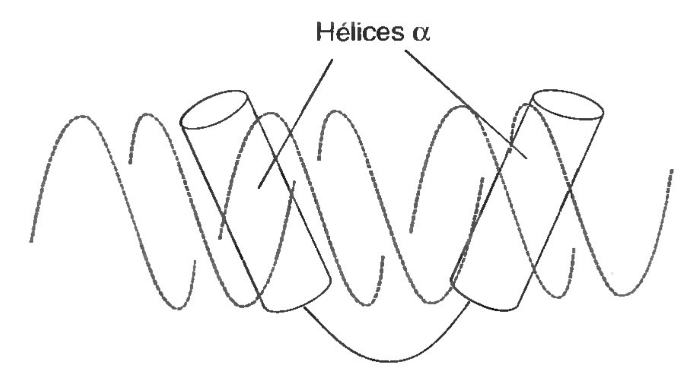


Fig. V-16 : Motif de liaison à l'ADN dit hélice-tour-hélice.

Fig. V-17 : Motif de liaison à l'ADN, dit en doigt de gant.

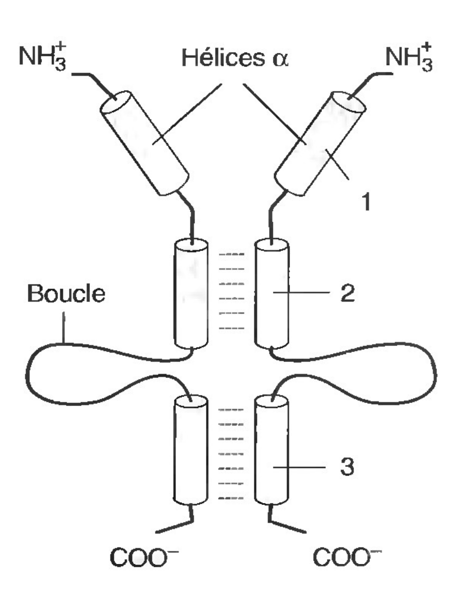


Fig. V-18 : Motif de liaison à l'ADN dit hélice-boucle-hélice.

aminés basiques est associée à l'ADN ; les autres (2 et 3), riches en acides aminés hydrophobes, assurent la liaison avec l'autre unité du dimère ; entre les domaines 2 et 3, la chaîne polypeptidique forme une boucle. Ces motifs se rencontrent, par exemple, au niveau des facteurs activant la synthèse des anticorps.

– ***Les motifs à crémaillère*** sont assez comparables aux précédents car ils possèdent deux chaînes polypeptidiques susceptibles également de s'associer en dimère *(fig. V-19)*. Chaque chaîne est constituée par deux hélices α : la première, riche en arginine, correspond au site de liaison à l'ADN, la seconde assure l'union des oligomères par l'intermédiaire de leucines ; celles-ci, réparties tous les 7 acides aminés sont disposées sur la même face d'une hélice ; elles ont ainsi la possibilité d'établir des interactions hydrophobes superposées, d'où le nom de crémaillère.

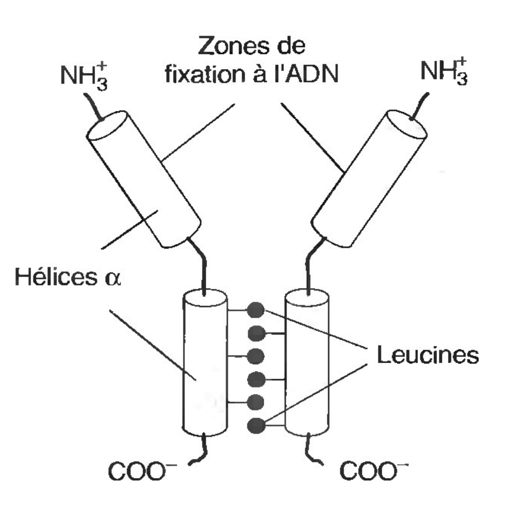


Fig. V-19 : Motif de liaison à l'ADN dit « à crémaillère ».

Plusieurs de ces motifs sont souvent identifiables dans une seule protéine régulatrice, ce qui permet une reconnaissance plus précise du site régulateur d'un gène donné. Les régulations sont aussi plus efficaces, plus variées lorsque la liaison à l'ADN s'effectue par l'intermédiaire de dimères identifiant des structures palindromiques sur l'acide nucléique. Il est en effet possible de former des **homodimères** ou des **hétérodimères** selon que les protéines régulatrices associées aux domaines de liaison sont identiques ou différentes *(fig. V-20)*. Si l'on considère seulement 4 protéines régulatrices (A, B, C et D), leur association en dimères permet la formation de 10 complexes régulateurs différents : **AA**, AB, AC, AD, **BB**, BC, BD, **CC**, CD, **DD** (les dimères en caractères gras sont les homodimères).

c. Domaine d'activation

Ils sont certainement très variés et font des facteurs de régulation les éléments clefs de l'adaptation des cellules à leur environnement ; ils sont encore mal connus.

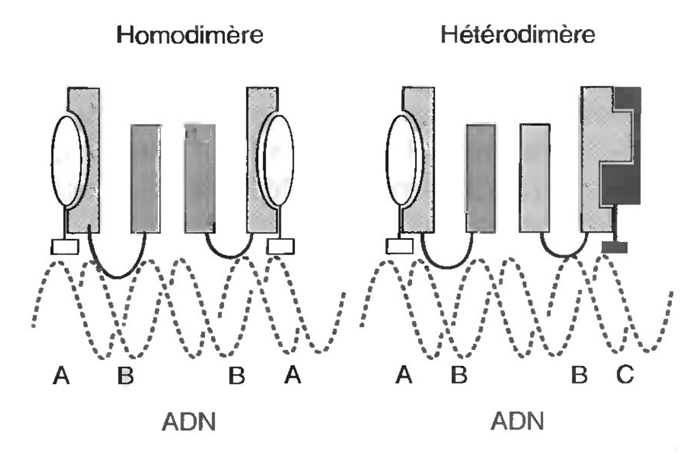


Fig. V-20 : Actions conjuguées de protéines régulatrices associées en dimères.
En augmentant le nombre des complexes régulateurs susceptibles d'intervenir, la formation d'hétérodimères permet de rendre plus précise la régulation de l'activité d'un gène.
(D'après P. LAMB et S.L. McKNIGHT, 1991.)

C. Du signal à la régulation

Les facteurs peuvent être transcrits à partir d'un gène régulateur à un moment précis de la vie de la cellule ; dès que l'ARN messager est traduit, la protéine régulatrice pénètre dans le noyau, identifie le ou les sites régulateurs et module l'activité des gènes de structure. Le gène producteur de cette protéine régulatrice contrôle alors un ensemble de réactions plus ou moins élevé, c'est **un gène régulateur**. Ces gènes régulateurs sont relativement nombreux ; on estime, en effet, que 5 à 10 % des gènes d'une cellule ont ce rôle. L'intervention de ces gènes est particulièrement importante au cours du développement des organismes (homéogènes).

Dans de nombreuses circonstances cependant, la cellule doit répondre rapidement à des stimuli extérieurs et la transcription des gènes nécessaires doit être réalisée immédiatement, ce qui peut être obtenu de plusieurs manières.

a. Activation d'un facteur préexistant

L'exemple le plus classique est celui des phosphorylations induites par l'AMP cyclique. Nous avons vu (p. 156) que certaines hormones interagissent avec un récepteur complémentaire membranaire qui diffuse dans la membrane pour s'associer à l'adénylate-cyclase inactive. Le complexe ainsi formé, actif, élabore, à partir de l'ATP, de l'AMP cyclique (voir p. 130) ; cette molécule se comporte comme un messager secondaire qui va provoquer une cascade d'activités enzymatiques internes. Il active, entre autres, *des kinases* ayant la propriété de fixer un groupement phosphate sur une sérine ou une tyrosine appartenant à un facteur présent dans le cytoplasme mais sous une forme inactive *(fig. V-21)*. Le facteur ainsi transformé gagne le noyau où, reconnaissant des sites régulateurs, il peut activer ou démarrer des transcriptions.

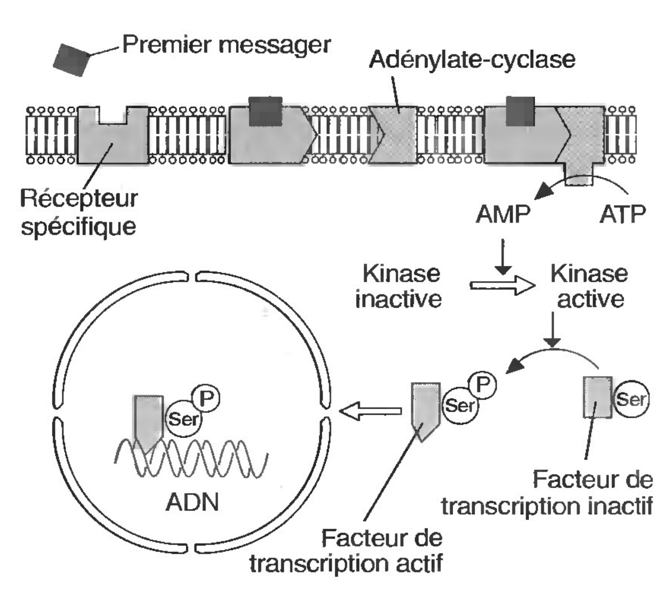


Fig. V-21 : Transduction d'un signal et activation d'une protéine régulatrice ou d'un facteur de transcription.

b. Activation par dissociation d'un complexe

Le facteur de transcription peut, dans le cytoplasme, être lié à une protéine ; le complexe, très volumineux, est dans l'impossibilité de pénétrer dans le noyau. Un stimulus externe agissant sur un récepteur membranaire spécifique peut alors, le plus souvent par *phosphorylation de la protéine liée*, libérer le facteur de transcription *(fig. V-22)* ; celui-ci

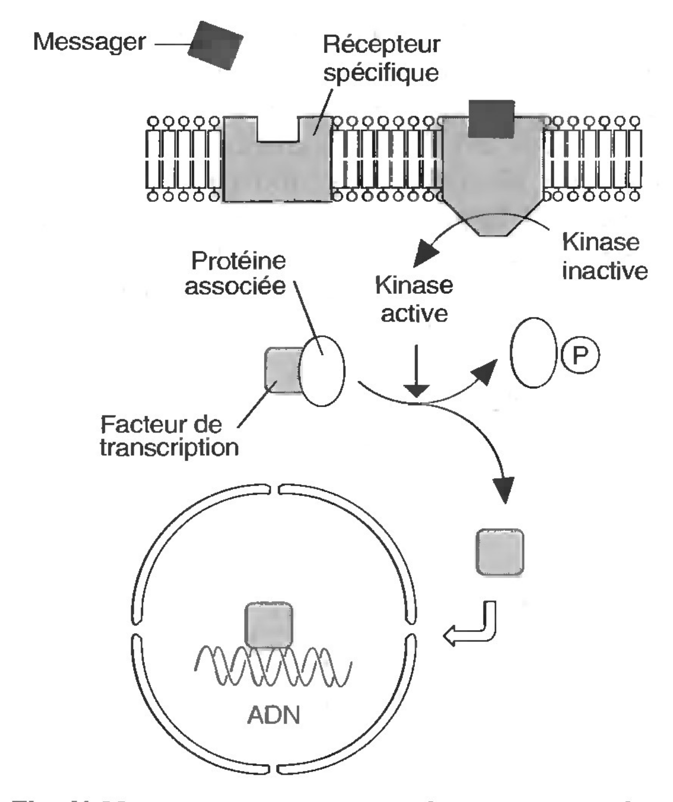


Fig. V-22 : Transduction d'un signal et activation d'un élément régulateur par dissociation d'un complexe inactif.

pénètre alors dans le noyau et module les transcriptions.

c. Les récepteurs d'hormones

Les hormones stéroïdes (œstrogènes, testostérone, progestérone...) sont des molécules lipophiles qui traversent librement la membrane plasmique. Dans la cellule, elles s'associent alors à un récepteur particulier.

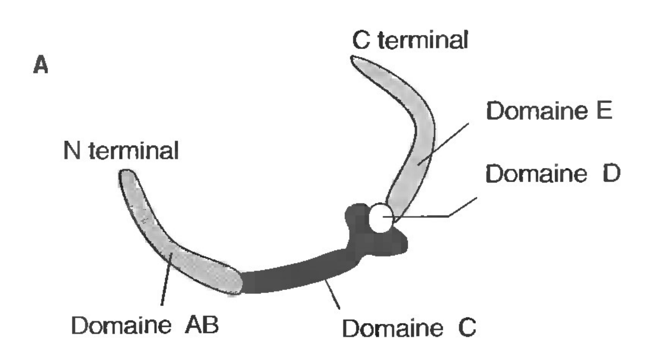
Ces récepteurs sont constitués par l'association de quatre domaines distincts *(fig. V-23, A).*

Le domaine E est spécifique de l'hormone à laquelle il se lie. *Le domaine C est le site de fixation à l'ADN*; il comprend des séquences en doigt maintenues par des atomes de zinc. *Le domaine D est une région charnière* autorisant des changements de conformation. Quant au *domaine AB, il assure l'activation du gène ciblé.*

Deux mécanismes coexistent.

Le premier est celui des hormones stéroïdes *(fig. V-23, B)*; le récepteur est situé dans le cytoplasme où il est lié à une protéine; il est alors inactif. La liaison avec l'hormone modifie sa conformation, ce qui a pour conséquence la séparation de la protéine. Le complexe récepteur-hormone pénètre alors dans le noyau, identifie les séquences cibles et active la transcription.

Le second est celui des récepteurs d'hormones thyroïdiennes *(fig. V-23, C)* qui sont en permanence liés à l'ADN cible. C'est donc l'hormone qui gagne le noyau et va activer le récepteur qui se comporte alors comme un facteur actif modulant la transcription.



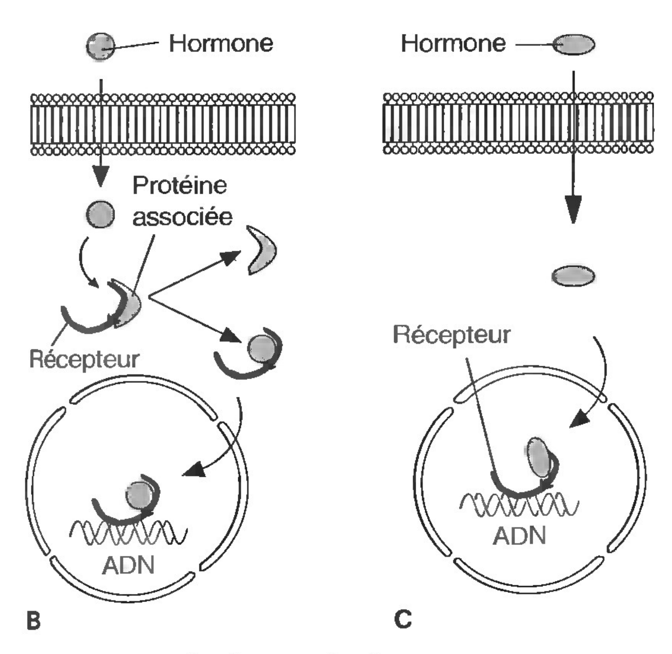


Fig. V-23 : Activation par les hormones.
A) Organisation du récepteur.
B) Activation d'un récepteur inactivé par une protéine cytosolique.
C) Récepteur lié en permanence à l'ADN.
(D'après V. LAUDET et D. STÉHELIN. Les récepteurs nucléaires. Pour la Science, 1993.)

2.3. RÉGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE

Elle peut s'exercer à deux niveaux.

A. Épissage alternatif

Nous avons vu (p. 221) que le transcrit primaire des Eucaryotes, l'ARN prémessager, est constitué par une succession de séquences ayant un devenir différent: les exons correspondent à celles qui associées par épissage constituent l'ARNm définitif, les introns sont celles qui après excision sont détruites.

Les cellules peuvent associer des exons différents et élaborer à partir d'un même gène, *donc d'un même transcrit primaire*, des ARN différents; c'est l'*épissage alternatif.*

Un exemple de cette modalité de maturation peut être fourni par le gène de la calcitonine *(fig. V-24). Dans les cellules de la thyroïde*, il est transcrit en un ARN prémessager qui après excision et épissage donne naissance à un ARN messager dont la traduction permet la synthèse de la calcitonine, une hormone polypeptidique ayant un rôle hypocalcémiant par action sur l'os, le rein et l'intestin. *Dans les*

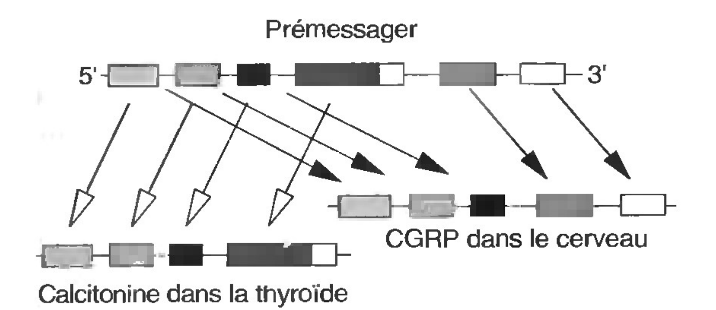


Fig. V-24 : Épissage alternatif.

cellules du cerveau, le transcrit primaire du même gène est épissé différemment et la protéine obtenue est un neuromédiateur, le CGRP *(Calcitonine **G**ene **R**elated **P**eptide)*. Deux protéines totalement différentes au point de vue fonctionnel ont ainsi été obtenues.

B. Durée de vie des ARN messagers

Nous avons vu que la mise en place à l'extrémité 3' du transcrit primaire d'une séquence poly A (voir p. 218) est considérée comme un facteur assurant *une plus grande longévité à la molécule*, donc la possibilité d'être traduite un nombre de fois plus ou moins élevé (en fonction, semble-t-il, de la longueur de cette séquence polyadénylée). Ainsi, les histones dont la synthèse est réalisée pendant une période très brève du cycle cellulaire, celle où l'ADN est dupliqué (voir p. 384), ont des messagers dépourvus de poly A.

Un autre mécanisme, qui n'est pas encore très bien compris sur le plan biochimique, concerne un stockage sous forme d'*ARN messagers longue vie*. Ces derniers se rencontrent toujours dans des types cellulaires particuliers : les ovules et les spermatozoïdes où, produits pendant la gamétogénèse, ils sont utilisés après la fécondation ; les organes subissant une période de vie ralentie (spores et graines des végétaux) où, élaborés pendant la période d'accumulation des matériaux de réserve, ils sont employés après la réhydratation.

Mais un élément régulateur essentiel pour ce qui concerne la durée de vie des messagers est constitué par des ARN de petite taille, ***les microARN***. Ces molécules ont été identifiées comme telles en 1993 chez un ver Nématode où elles se sont révélées être des acteurs importants dans la régulation du développement de l'organisme. Au cours des dix dernières années, on a pu les identifier chez tous les animaux (on en connaît actuellement plus de 200 chez l'homme) et chez tous les végétaux (où on a pu montrer par exemple qu'ils sont en grande partie responsables de la morphogenèse de la feuille). Ces microARN sont formés par 19 à 24 nucléotides dont la séquence d'enchaînement est variable. Ils dérivent d'un transcrit primaire constitué d'environ 70 nucléotides. Ce précurseur comporte plusieurs séquences complémentaires, ce qui autorise son reploiement en une structure à boucles *(fig. V-25)* ; il est découpé en

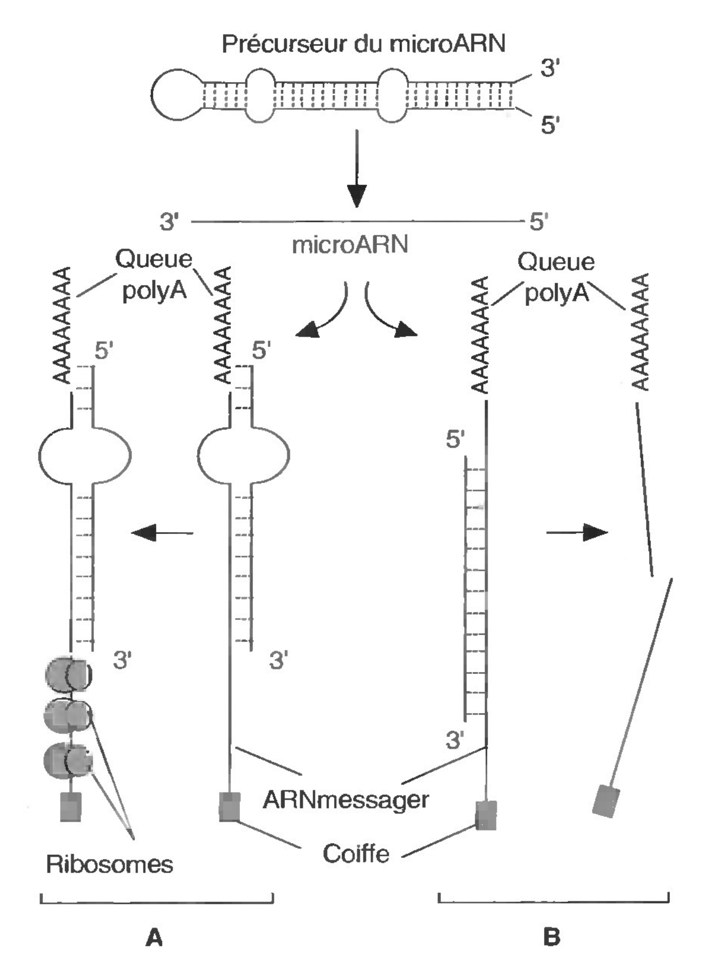


Fig.V-25 : Modalités de formation et d'action des microARN.
A) Par appariement incomplet des deux molécules
B) Par coupure de l'ARN messager en fragments non traduisibles.

microARN fonctionnel par des protéines enzymatiques (Dicer chez les animaux, CAF chez les plantes).

Ces microARN régulent l'activité cellulaire en limitant ou interdisant la traduction; associés à des protéines, ils interceptent en effet le messager en s'associant à lui par l'intermédiaire de séquences complémentaires. On estime qu'il existe deux voies d'inactivation. Dans la première *(fig. V-25, A)*, le microARN s'associe au messager en une région modérément complémentaire située de préférence vers l'extrémité 3', chevauchant plus ou moins la séquence polyA; il y a donc formation de boucles, là où l'appariement n'est pas possible, interrompant la progression des ribosomes et la traduction, ou la limitant si l'appariement intéresse la seule région polyA. Dans la seconde voie *(fig. V-25, B)*, l'appariement est complet et le microARN, à l'instar de ce que réalisent les snARN dans les splicéosomes et les ARNsno du nucléole, coupe le messager en fragments qui ne sont plus traduisibles ou, comme les ARNsi (*si*, pour *small interfering*) qui interfèrent avec les ARN viraux, se fixe au messager et servant de signal permet alors son inactivation et sa destruction par des nucléases.

On a tendance à considérer actuellement que ces microARN, qui sont codés au niveau de l'ADN dans des régions situées entre des gènes bien caractérisés, sont des éléments essentiels de la régulation du fonctionnement cellulaire; ils permettent d'interrompre ou, si leur appariement est limité à la queue polyA, d'atténuer la traduction du message et donc de renouveler ou de limiter la quantité des protéines dans la cellule.

2.4. RÉGULATION TRADUCTIONNELLE ET POST-TRADUCTIONNELLE

Les modifications post-traductionnelles sont plus nombreuses et mieux connues; elles correspondent à *la maturation des protéines* et sont réalisées par deux voies, celle des *clivages protéolytiques* et celle des *glycosylations*, étudiées par ailleurs (p. 305). Leur nature et leur importance dépendent essentiellement des enzymes présentes dans le réticulum endoplasmique; elles sont donc également sous le contrôle du génome nucléaire.

La protéolyse sélective est une autre voie de régulation mise en évidence au cours des dernières décennies. La dégradation des protéines est pour les cellules une activité essentielle permettant de contrôler sa croissance et son fonctionnement; c'est également un moyen de répondre de manière adaptée aux variations de son environnement. En effet, dans une cellule en période de croissance active, il y a environ 10 000 molécules protéiques et toutes ces molécules sont renouvelées périodiquement. Certaines ont un rôle structural ou un rôle moteur et sont donc relativement stables; d'autres sont des enzymes ou des facteurs de régulation qui sont produits et détruits très rapidement. C'est parce que leur rôle est très variable que ces molécules ont des durées de vie très différentes: certaines restent fonctionnelles pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois, alors que d'autres ont une durée de demie-vie inférieure à 5 mn; ces dernières sont, bien entendu, celles qui ont à jouer un rôle régulateur. *La protéolyse est un moyen de limiter la durée de vie de ces molécules.*

La plupart des protéines sont détruites dans le cytoplasme et cette protéolyse permet d'éliminer les protéines anormales ou endommagées (mutation, dénaturation, choc thermique), aussi bien que de limiter le temps d'action d'une protéine enzymatique ou régulatrice. Le bon déroulement du métabolisme implique en effet un contrôle de la quantité de certaines enzymes clés; cette régulation peut être obtenue par un jeu complexe de phosphorylations-déphosphorylations, mais également par la destruction des molécules et la synthèse de nouvelles ayant une activité différente. La durée de vie de nombreuses molécules régulatrices doit en effet être limitée de manière extrêmement précise; nous verrons que le cas des cyclines (p. 400) qui règlent le bon déroulement du cycle cellulaire, est un bon exemple de ces interventions successives, la destruction d'une de ces molécules permettant la synthèse et la mise en œuvre d'une autre; il ne faut pas

oublier que certains facteurs de transcription ont également une durée de vie très brève.

Le bon déroulement de cette protéolyse impose qu'elle soit sélective, ce qui entraîne deux contraintes majeures: *le substrat, c'est-à-dire la molécule à détruire, doit être identifié* ***sans ambiguïté****; la protéolyse doit concerner uniquement ces protéines*, ce qui implique que les protéases intervenant ne puissent pas dégrader les autres molécules cytosoliques.

La plupart de ces dégradations sélectives empruntent *la voie de l'ubiquitine*, une petite protéine de 76 acides aminés, découverte dans les années 80. Cette molécule, qui a été retrouvée chez tous les organismes animaux, végétaux, et les champignons, possède des séquences très conservées; elle est très ubiquiste d'où son nom. Elle est aussi très résistante aux acides, aux bases, à la dénaturation thermique.

L'ubiquitine est une molécule qui signale la protéine à détruire en se liant à elle de manière covalente; c'est donc un marqueur. Comme il y a une ubiquitine et une grande variété de substrats, c'est le mécanisme assurant la liaison des deux molécules qui permet d'établir la spécificité. Ce mécanisme nécessite l'intervention successive de plusieurs molécules *(fig. V-26)*.

De volumineux complexes multienzymatiques, *les protéasomes*, interviennent ensuite. Ils ont la forme d'un cylindre creux et sont formés par plusieurs dizaines de polypeptides *(fig. V-27)*. En l'absence d'ATP, le complexe se dissocie en plusieurs sous-unités. Une première, dont le coefficient de sédimentation est

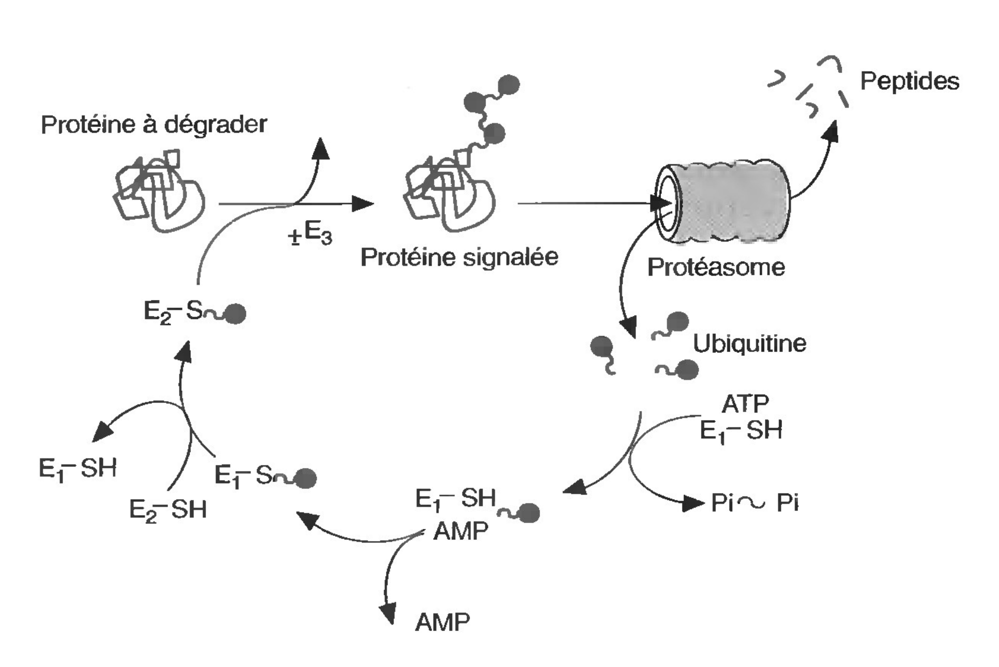


Fig.V-26 : Protéolyse par la voie de l'ubiquitine.
L'activation de l'ubiquitine est un processus consommateur d'énergie qui fait intervenir successivement plusieurs enzymes intermédiaires, E_1, E_2 et, moins régulièrement, E_3. La première E_1 est une enzyme d'activation qui permet la formation d'un intermédiaire à haute énergie en utilisant de l'ATP; la deuxième correspond à un transporteur spécifique; un complexe ubiquitine-E_2 est alors formé et E_1 est libérée. Ce second complexe peut s'associer directement à la protéine à détruire et ainsi la signaler, mais dans certains cas une troisième enzyme E_3, une ubiquitine-ligase, est nécessaire. L'ubiquitine est ensuite transférée sur la molécule à détruire, son extrémité N-terminal se liant à un résidu lysine de la protéine. Une seule ubiquitine fixée n'indique pas que la protéine est à détruire, mais elle altère sa structure et sa fonction. Le signal de destruction est conféré par la liaison d'une chaîne d'ubiquitines. Ce sont donc les transporteurs E_2 (et à un moindre degré E_3), dont la diversité est très grande, car il existe de nombreuses isoformes (de nombreux gènes les codant ont été identifiés), qui établissent la spécificité de la destruction; celle-ci est d'autant plus grande que ces transporteurs agissent en cascade.
(D'après Vierstra, 1996.)

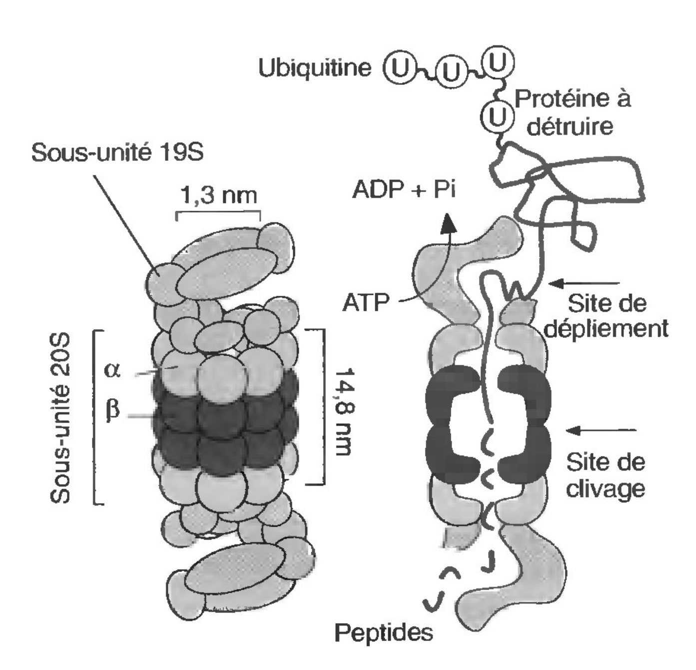


Fig. V-27 : Protéasomes.
Les protéasomes sont constitués par l'association d'une sous-unité 20S formée par 2 anneaux de 7 polypeptides α et 2 anneaux de 7 polypeptides β et de deux sous-unités 19S. À l'une des extrémités du cylindre ainsi réalisé, les protéines ubiquitinisées sont reconnues, dépliées et engagées dans le complexe ; l'ubiquitine, décrochée, est relarguée. La zone de clivage, qui fait intervenir plusieurs protéases différentes, est située dans la zone médiane ; les courts peptides produits sont libérés dans le cytosol à l'autre extrémité.
(D'après R.D. VIERSTRA, 1996.)

de 20 S, est constituée par 4 anneaux superposés ; c'est elle qui coupe la protéine en fragments de 6 à 9 résidus ; plusieurs protéases y ont été identifiées. Les deux autres sous-unités, chacune ayant un coefficient de sédimentation de 19 S, se lient aux extrémités du cylindre ; c'est l'une d'entre elles qui identifie le substrat ubiquitinisé, le déroule et le fait pénétrer dans le protéasome. *Les enzymes protéolytiques ne peuvent donc intervenir que sur les protéines signalées,* les autres, qui ne peuvent accéder au cylindre, sont protégées de toute dégradation car les sites catalytiques des enzymes sont séquestrés dans le compartiment central du protéasome.

Le système est donc parfaitement adapté aux processus de régulation que nous avons évoqués : contrôler la nature ou la concentration des protéines cellulaires. Il joue un rôle important dans le fonctionnement cellulaire et il semble établi que certaines pathologies humaines sont en rapport avec les dérèglements de cette protéolyse contrôlée : ainsi les maladies d'Alzheimer et celle de Hutington s'accompagnent de l'accumulation de protéines ubiquitinylées.

LES ARN, MOLÉCULES CLÉS DU FONCTIONNEMENT CELLULAIRE

Les ARN messagers, ribosomaux et de transfert ont été isolés depuis fort longtemps et leurs rôles dans la synthèse protéique a été compris au début de la seconde moitié du XX[e] siècle. On connaissait par ailleurs de très nombreux autres petits ARN, petits car constitués de quelques dizaines de nucléotides seulement, qui ne codaient pas pour des protéines, dont la fonction n'était pas connue et que l'on avait tendance à considérer comme résultant de dégradations fonctionnelles ou accidentelles (en cours d'extraction) des ARN ribosomaux, messagers ou de transfert.

Ces dernières années ont montré qu'il n'en était pas ainsi et que ces petits ARN étaient, d'une part très divers, d'autre part fonctionnellement très importants et que leur synthèse était parfaitement contrôlée par la cellule.

On peut actuellement les regrouper en quatre catégories en fonction de leur rôle.

Les microARN ou ARNmi sont des molécules constituées par l'enchaînement de 22 à 24 nucléotides qui, lorsqu'ils s'apparient à l'ARN messager avec lequel ils possèdent une imparfaite complémentarité de séquences, limitent ou interrompent la traduction et donc la synthèse des protéines. Il en existe un nombre important ; ils sont très différents les uns des autres, chacun étant plus ou moins parfaitement complémentaire d'un ou plusieurs ARN messagers, ce qui leur confère un rôle régulateur essentiel.

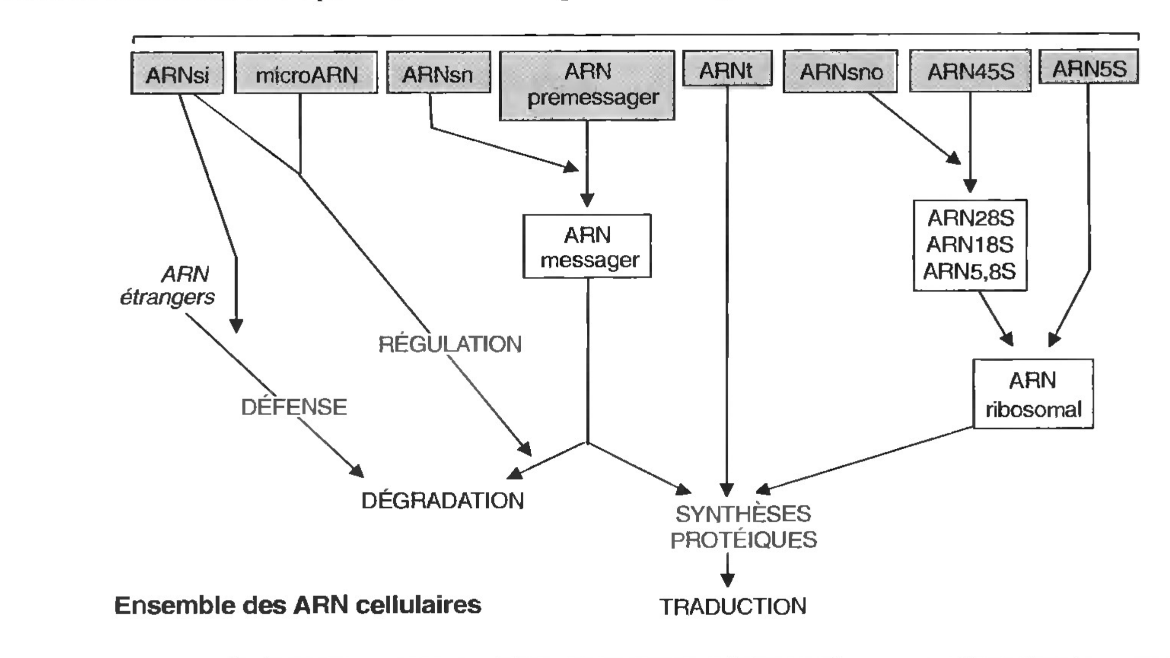
Les ARN interférents ou ARNsi (*si*, de l'anglo-saxon *small interfering*) sont constitués par 20 à 22 nucléotides et jouent un rôle régulateur des transcriptions comparable à celui des microARN ; leur mode d'action est toutefois différent ; ces ARN se lient aux messagers avec lesquels ils possèdent une séquence parfaitement complémentaire et, servant de signal, permettent leur identification par des protéines qui coupent l'ARNm, le rendant ainsi intraduisible par les ribosomes. Leur mode d'action est comparable aux ARN

qui, en s'associant aux ARN viraux, permettent leur destruction par la cellule. Ils n'en sont d'ailleurs peut-être pas différents.

Les petits ARN nucléolaires ou ARNsno (*sno*, de l'anglo-saxon ***small nucleolar***) orchestrent les coupures de l'ARN 45S qui, dans le nucléole, vont permettre la formation des ARNr 28S, 18S et 5,8S (voir p. 217).

Les ARNsn (*sn*, de l'anglo-saxon ***small nuclear***) sont les constituants des splicéosomes qui permettent l'excision et l'épissage des ARN prémessagers (voir p. 222-223).

Le tableau ci-dessous répertorie les différents types d'ARN et représente sous forme schématique leur niveau d'intervention. Leur identification a considérablement modifié la compréhension du mode de régulation des synthèses protéiques ; leur découverte a sans aucun doute bouleversé notre interprétation des modalités du fonctionnement cellulaire et devrait permettre, dans les prochaines années, de mieux comprendre divers dysfonctionnements cellulaires et, sinon d'apporter des solutions à court terme, d'identifier l'origine de troubles fonctionnels ; ils pourraient à ce titre présenter un grand intérêt en médecine.



Ensemble des ARN cellulaires

3. PERTURBATION DE LA RÉGULATION CELLULAIRE : VIRUS ET ONCOGÈNES

Nous avons vu (p. 14) que les virus sont des parasites subcellulaires obligatoires se multipliant très rapidement dans l'hôte dont ils peuvent entraîner la mort.

Toutes les activités du virus sont dirigées par leur reproduction et la pénétration de l'acide nucléique viral dans la cellule hôte modifie le métabolisme de celle-ci de manière telle que les molécules du parasite sont synthétisées préférentiellement.

Les constituants du virus sont toujours élaborés dans un ordre déterminé ce qui permet la construction simultanée d'un grand nombre de virions ; l'existence de ces synthèses séquentielles est particulièrement important[e] chez les espèces dont le cycle se termine pa[r] la lyse de la cellule hôte.

Chez les bactériophages T par exemple, o[n] peut regrouper les synthèses en trois période[s] successives.

1) *Une phase extrêmement précoce*, dont l[a] durée se situe entre 4 et 8 minutes, pendan[t] laquelle sont produites l'ARN polymérase phagique et des molécules particulières dont l[e] rôle est de bloquer les réactions de synthèse d[e] la cellule hôte.

2) *Une phase précoce*, qui se prolonge de [...] à 15 minutes, caractérisée par l'élaboratio[n]

des enzymes indispensables à la réplication de l'ADN viral (ADN polymérase, ligase...). Cette période s'achève lorsque débute la réplication de l'acide nucléique.

3) *Une phase tardive*, relativement courte (6 à 8 minutes), pendant laquelle l'ADN est dupliqué et les constituants de la capside sont synthétisés. C'est également la période d'élaboration de molécules qui permettent l'assemblage des protéines de la capside, sans toutefois intervenir dans l'architecture de celle-ci, et les enzymes (comme le lysozyme) assurant la destruction (la lyse) de la cellule bactérienne.

Toutes les protéines de la capside sont produites simultanément mais leur assemblage est par contre séquentiel. L'association des deux premières protéines modifie leur conformation de telle sorte qu'une troisième peut venir se lier à elles ; le nouveau complexe réalisé peut alors s'unir à une quatrième molécule. *Ainsi, de proche en proche, la particule virale se construit.* Chez certains virus, comme celui de la mosaïque du tabac (virus à ARN), il s'agit d'un simple autoassemblage, mais chez d'autres (phages T par exemple) l'association des différentes capsomères implique l'intervention de protéines dirigeant la construction. L'ADN est inséré dans la capside lorsque celle-ci est complètement édifiée.

Le cycle des virus peut être mieux compris si on considère les modalités d'expression de leur génome. Le SV 40 est un petit virus infectant les singes rhésus dont la capside est constituée par trois sortes de protéines nommées VP1, VP2 et VP3. L'information génétique virale est située sur *une molécule d'ADN circulaire en double hélice* comportant 5243 paires de bases. Le séquençage de cette molécule a permis de mettre en évidence deux unités de transcription, une sur chaque brin, donc orientées en sens opposés à partir de deux promoteurs superposés *(fig. V-28)* qui se situent d'ailleurs au même niveau que le point d'origine de la réplication.

Lorsque le virus pénètre dans la cellule, l'acide nucléique migre vers le noyau ; il est associé, sauf dans la région des promoteurs, à des nucléosomes produits par les cellules du singe ; c'est un minichromosome. *Les deux unités de transcription sont ensuite transcrites en sens opposés et successivement.* **La région précoce** code deux protéines, grand T et petit T, produites à partir d'un même transcrit primaire épissé différemment. Grand T est une protéine activatrice qui stimule les gènes de réplication de l'hôte (même lorsque la cellule est en phase G_0 du cycle, voir p. 399), ce qui déclenche la réplication de l'ADN viral. Lorsque celle-ci est achevée, la transcription de **la région tardive** est déclenchée, ce qui conduit à la formation d'un prémessager à introns dans lequel des sites d'excision et d'épissage différents permettent la formation des trois protéines VP1, VP2 et VP3 *(fig. V-28)*.

C'est donc par regroupement des gènes codant les enzymes et les protéines de la capside et par une régulation de l'ordre des transcriptions que les virus réalisent leur cycle de développement. Le mécanisme est peu complexe dans le cas du SV 40 dont la capside est simple et l'information génétique limitée. Elles sont sur le même principe chez les bactériophages T dont le génome est plus important. Dans tous les cas, la bonne réalisation du cycle implique qu'*un gène d'une période du cycle code une protéine qui est nécessaire à la transcription des gènes de la période suivante* ; ces protéines sont régulatrices. C'est par l'intermédiaire de ces contrôles successifs qu'est déclenchée **la cascade des transcriptions** aboutissant à l'assemblage des virions.

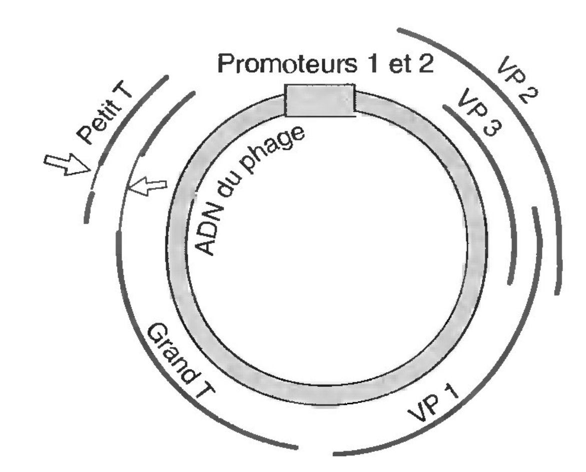


Fig. V-28 : Génome du virus SV 40 et localisation des transcrits.
Les flèches marquent la position des introns de grand T et petit T.

Le mécanisme peut être très complexe comme c'est le cas pour le phage λ chez qui deux cycles sont possibles. En effet, lorsque l'ADN entre dans la cellule hôte, il peut soit être intégré dans l'ADN bactérien et demeurer silencieux formant alors **un prophage** (voie lysogénique dans laquelle l'acide nucléique est répliqué en même temps que celui de l'hôte), soit exprimer toutes ses fonctions et produire une centaine de particules en détruisant la cellule qui l'abritait (voie lytique).

Le génome du phage λ est une molécule d'ADN linéaire en double hélice d'environ 48 kilobases sur laquelle les gènes sont disposés de manière dissymétrique à droite et à gauche d'une zone régulatrice *(fig. V-29)*.

Dans la voie lysogénique, le gène *CI* est transcrit et traduit: le produit protéique obtenu est le répresseur de λ qui reconnaît spécifiquement les opérateurs associés aux promoteurs PR et PL des gènes *Cro* et *N* et s'y fixe; ce répresseur interdit le démarrage de la synthèse et ainsi prévient la multiplication virale. C'est *une régulation négative* puisque la protéine empêche la transcription.

Dans la voie lytique, l'ADN du phage est circularisé* et les transcriptions sont réalisées de part et d'autre de la zone régulatrice par lecture de brins différents *(fig. V-30)*; l'expression du cycle lytique est obtenue par des régulations en cascade. On peut distinguer trois périodes dans ce cycle.

La période extrêmement précoce pendant laquelle les transcriptions, réalisées par les ARN polymérases de l'hôte, débutent aux promoteurs droit (PR) et gauche (PL) et sont arrêtées respectivement aux sites terminateurs R et L. Deux gènes sont transcrits. Le premier est *Cro* dont le produit protéique a une double action puisqu'il inhibe la synthèse du répresseur *CI* (et donc la lysogénie) et bloque les gènes ultraprécoces *Cro* et *N* (leurs produits ne sont en effet plus utiles après cette très courte période initiale). Le second, *N*, est à l'origine d'une protéine qui s'associe aux sites

* Dans la voie lysogénique, l'introduction de l'ADN du virus dans celui de la bactérie est également précédée de sa circularisation.

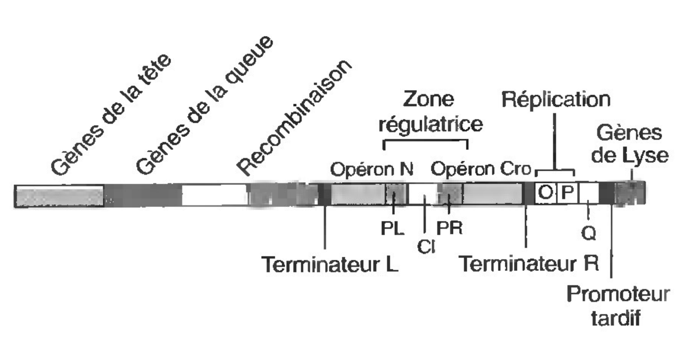


Fig. V-29 : Organisation du génome du phage l avant sa circularisation.

terminateurs R et L et les inactive; *les polymérases peuvent alors progresser sur l'ADN du phage*, **le stade précoce retardé est initié**. *La régulation est positive* puisque c'est la fixation de la protéine sur le site régulateur qui permet la transcription.

La période précoce retardée est celle pendant laquelle sont synthétisées les protéines nécessaires à la réplication, dont les gènes sont situés au-delà du terminateur localisé à droite de *Cro*, et ceux permettant les recombinaisons. Le gène *Q* est également transcrit; il est à l'origine d'une protéine qui inhibe d'autres sites terminateurs, ce qui permet le passage de l'ARN polymérase vers les gènes tardifs; c'est là encore une régulation positive.

La période tardive est celle pendant laquelle sont transcrits les gènes codant la tête, la queue et les protéines assurant la lyse bactérienne.

Le phage λ montre donc un exemple complexe de régulations qui permettent soit le déroulement d'une phase de multiplication importante, soit la mise en place d'un prophage silencieux. La transition de la voie lysogénique à la voie lytique, qui peut être induite par des agents extérieurs (UV par exemple), obéit à un mécanisme complexe qui sort du cadre de cet ouvrage.

Les rétrovirus forment une catégorie de virus assez particuliers. Leur génome, *diploïde*, est constitué par deux copies d'un ARN simple brin, court puisqu'il ne comporte pas plus de 10 kilobases. La *figure V-31* montre un exemple des séquences rencontrées chez ce type de virus.

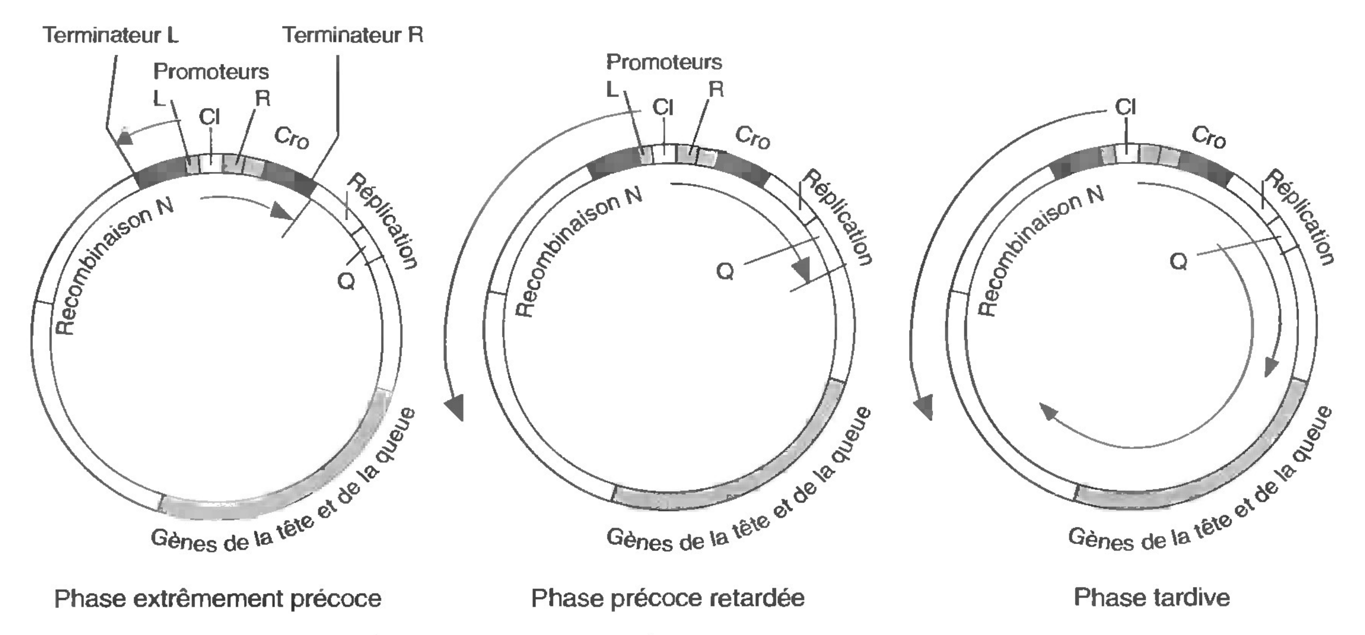


Fig. V-30 : Transcription du génome du phage λ après circularisation.
Les flèches rouges indiquent les points de départ et de terminaison des transcriptions au cours des trois phases du cycle de développement viral.

Lorsque l'ARN viral pénètre dans la cellule hôte, il est accompagné par des enzymes spécifiques ; l'une d'entre elle, *la transcriptase inverse* *, permet une rétrotranscription qui aboutit par un mécanisme complexe, réalisé en plusieurs étapes (transcription d'un ARN en ADN, formation d'un complexe ADN-ARN, puis élimination de l'ARN et synthèse d'un ADN complémentaire du premier), à la constitution d'un ADN double brin circulaire qui grâce à une enzyme particulière, *l'intégrase*, est inséré dans l'ADN de l'hôte ; il constitue alors **un provirus**.

La séquence RU5 PB, appelée séquence LTR (pour *Long Terminal Repeat*, car la rétrotranscription permet de l'insérer aux deux extrémités de la molécule avant sa circularisation), est *un promoteur fort* comportant une boîte TATA, une boîte CAAT et des sites activateurs ; elle permet une transcription rapide et efficace, par l'ARN polymérase II de l'hôte, d'*un ARN messager sans introns* ; une partie de ces transcrits n'est pas modifiée *(fig. V-32)* et n'est pas traduite, elle constituera *le génome de nouveaux virus* ; l'autre partie est clivée donnant naissance après traduction aux protéines virales associées à l'ARN au cœur du virus et aux protéines de la capside qui varient d'un virus à l'autre (gène *gag*), aux enzymes accompagnant l'ARN (transcriptase inverse, intégrase, protéase) durant la période de transfert d'une cellule à une autre (gène *pol*), aux glycoprotéines spécifiques de l'enveloppe permettant entre autres l'association au plasmalemme de la cellule à infecter (gène *env*).

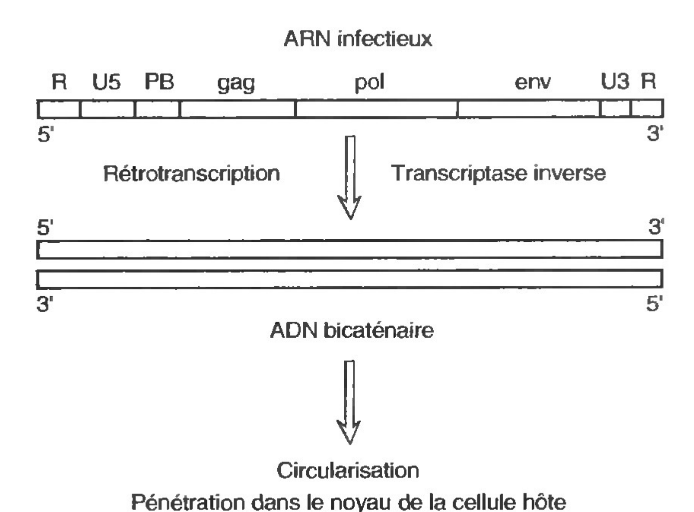


Fig. V-31 : Génome infectieux d'un rétrovirus et transformations qu'il subit au début de l'infection d'une cellule hôte.

* Cette enzyme pourrait avoir joué un rôle évolutif important ; on suppose en effet qu'elle serait à l'origine des nombreuses séquences répétées rencontrées chez les mammifères, séquences qui autorisent certaines recombinaisons génétiques.

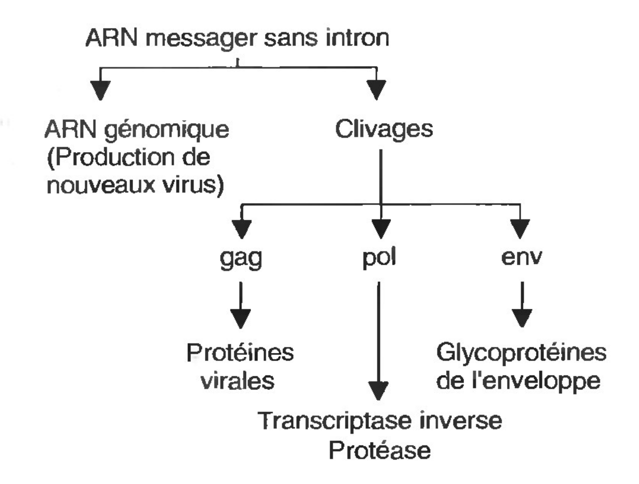


Fig. V-32 : Les deux évolutions possibles du transcrit primaire d'un rétrovirus.

Le nombre des cancers d'origine virale est faible, environ 1 %. Les virus susceptibles de les induire sont dit ***oncogènes*** ; ils ne lysent pas la cellule mais ils modifient sa croissance, *ils la transforment* et cette transformation est transmise à toute la descendance. On les trouve chez la plupart des formes virales, virus à ADN et rétrovirus, mais il est difficile d'apprécier l'importance réelle de cette propriété. En effet, un virus donné, le SV 40 par exemple, se reproduit très rapidement dans les cellules du singe rhésus, est inoffensif chez l'homme mais oncogène chez les rongeurs. Les cellules du singe sont dites *permissives pour* le SV 40, celles de l'homme et des rongeurs sont *non permissives*, mais si ces dernières ne sont pas infectées elles peuvent être transformées. *Ces cellules transformées croissent de façon continue, anarchique, sans se préoccuper des cellules voisines.*

Lorsque le virus pénètre dans une cellule qu'il va transformer, son information est, dans un premier temps, transcrite ; on identifie en effet rapidement des ARNm viraux. Puis la cellule, même si elle est en phase G_0, réplique son ADN quelques heures plus tard ; c'est l'*induction* ; l'état transformé est alors acquis ; il est définitif ; les particules virales ne sont pas libérées, sauf chez les oncogènes à ARN.

Le génome du virus est cependant présent dans les cellules hôtes, même s'il ne s'y multiplie pas. En effet, si on fait fusionner une cellule de souris transformée par SV 40 avec une cellule permissive de singe, le cycle lytique est engagé.

C'est après ouverture de la molécule d'ADN circulaire que le génome viral est intégré à celui de l'hôte ; c'est avec lui qu'il se duplique. Dans le cas du SV 40, la région précoce est exprimée, mais la région tardive ne l'est pas ; en effet, le gène grand T est indispensable à l'installation de la transformation et à son maintien ; on ignore cependant comment il agit.

Chez les rétrovirus, c'est après la rétrotranscription que le génome viral est intégré à celui de l'hôte. Chez ces virus, comme celui du sarcome de Rous, un gène supplémentaire est présent, c'est le gène *src (fig. V-33)*, qui est indispensable à la transformation. La protéine qu'il code est une protéine kinase qui phosphoryle les tyrosines sur les protéines. Cette enzyme n'intervient pas dans le déroulement du cycle lytique car une mutation du gène *src* ne l'affecte pas.

D'autres oncogènes produisent des protéines ayant une action différente, intervenant au niveau de facteurs de croissance ou codant des récepteurs de ces facteurs, voire des protéines nucléaires. On a peu d'informations sur les modalités exactes de leur mode d'action. *On a toutefois constaté que les séquences de plusieurs oncogènes viraux sont très proches de celles de gènes trouvés normalement dans la cellule* ; les différences sont très souvent minimes ; ces gènes sont appelés ***proto-oncogènes*** ; ce sont des gènes d'origine très ancienne, conservés au cours de l'évolution, qui doivent intervenir dans la régulation des mécanismes aboutissant à la multiplication cellulaire. Pour les différencier on fait précéder l'intitulé de l'oncogène viral de la lettre v (*v-scr* par exemple) et celui du proto-oncogène de la lettre c (*c-scr*).

Certains agents extérieurs, comme les UV, certaines mutations peuvent transformer ces proto-oncogènes en oncogènes véritables susceptibles d'induire la formation de tumeurs.

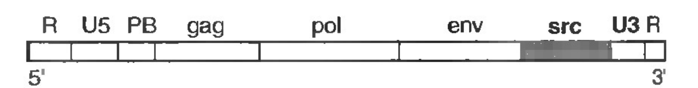


Fig. V-33 : Représentation schématique du génome du virus du sarcome de Rous.

CHAPITRE VI

Le cytosquelette et la motilité cellulaire

La motilité est une des fonctions caractéristiques des cellules vivantes. Elle peut s'exprimer à plusieurs niveaux :

– au **niveau tissulaire**, surtout au niveau des muscles, ce qui va permettre les mouvements d'organes (mouvements des membres, mouvements du cœur, mouvements d'ouverture et de fermeture des coquilles...) ;

– au **niveau cellulaire** : il s'agit de la motilité des unicellulaires (bactéries, protozoaires, protophytes) et aussi des cellules sexuelles mâles ; il s'agit aussi des migrations cellulaires pendant l'embryogenèse, des migrations des fibroblastes ou des cellules cancéreuses ;

– au **niveau subcellulaire** : il s'agit de la motilité des organites de la cellule (mouvements des vésicules d'exocytose et d'endocytose, courants cytoplasmiques, division cellulaire...).

C'est ce dernier aspect qui va être abordé dans ce chapitre. On connaissait évidemment depuis longtemps les structures les plus visibles conférant une motilité aux cellules, tels les flagelles et les cils. Concernant le cytosol (le plus souvent appelé hyaloplasme) il était admis qu'il constituait une gelée informe, une sorte de « soupe » riche en enzymes et en réserve de combustibles et animée seulement de mouvements browniens. On savait que dans le cytosol sont effectuées de multiples réactions du métabolisme cellulaire, par exemple la glycolyse permettant la récupération de l'énergie contenue dans le glucose (voir chap. VIII, 2e partie), ce qui permettait de parler de **carrefour métabolique.** Depuis une vingtaine d'années seulement on est arrivé à l'idée qu'il existe un **cytosquelette**, véritable squelette à l'échelle subcellulaire, présent dans les cellules des Eucaryotes et qui est responsable de l'organisation dynamique du protoplasme. En revanche, les cellules procaryotes sont dépourvues de cytosquelette.

Le cytosquelette comporte 4 types d'éléments, définis sur la base de critères morphologiques :

– les **microfilaments**, dont le diamètre est de l'ordre de 6 à 7 nanomètres ; c'est principalement le réseau d'*actine* ;

– les **filaments intermédiaires**, dont le diamètre est compris entre 7 et 11 nanomètres ; ils sont variables selon les types cellulaires ;

– les **microtubules**, dont le diamètre est voisin de 25 nanomètres ; ils sont essentiellement composés de *tubulines* ;

– le **réseau microtrabéculaire**, réseau très fin dont l'existence même est encore controversée. Il assure probablement des rigidifications locales du cytosol (il ne sera pas considéré en détail ici).

1. LES MICROFILAMENTS

Les microfilaments ont été découverts dans les années 1970. Principalement formés d'**actine**, ils constituent des filaments qui s'associent entre eux pour former des **câbles** dans la cellule.

Ils existent dans toutes les cellules Eucaryotes. D'abord étudiés dans les cellules musculaires où l'actine constitue une molécule principale, les microfilaments ont été ensuite localisés dans d'autres cellules, non musculaires.

1.1. DÉTECTION IMMUNOCYTOCHIMIQUE DES MICROFILAMENTS

Comme pour les autres éléments du cytosquelette, c'est grâce au développement des méthodes immunocytochimiques, en particulier de l'*immunofluorescence* indirecte, que cette localisation a été rendue possible.

Des anticorps anti-actine sont préparés dans une espèce animale et appliqués à des types cellulaires différents. Ils sont ensuite révélés par un deuxième anticorps couplé à un marqueur fluorescent visible en microscopie à ultra-violets. Les observations révèlent la présence de longs câbles fluorescents formés d'épais faisceaux de microfilaments ; ces câbles sont répartis dans la cellule et sont souvent très abondants sous la membrane plasmique qu'ils longent parallèlement.

En multipliant les observations immunocytochimiques sur des cellules eucaryotes diverses, il est apparu que la plupart des cellules en interphase, qu'elles soient végétales ou animales, possédaient ce type de réseau.

1.2. STRUCTURE DE L'ACTINE

L'actine est une protéine globulaire. Elle est très abondante dans les muscles striés, en particulier dans les filaments fins, dont elle est facile à extraire.

L'actine peut être observée sous deux formes. Sous sa forme monomérique, l'actine globulaire ou **actine G** est une protéine dont la masse moléculaire est de l'ordre de 42000 Da. Elle comprend 376 acides aminés. Chaque molécule d'actine G est liée à du calcium Ca^{2+} qui stabilise sa conformation globulaire et à une molécule d'ATP liée de façon non covalente *(fig. VI-1, A)*.

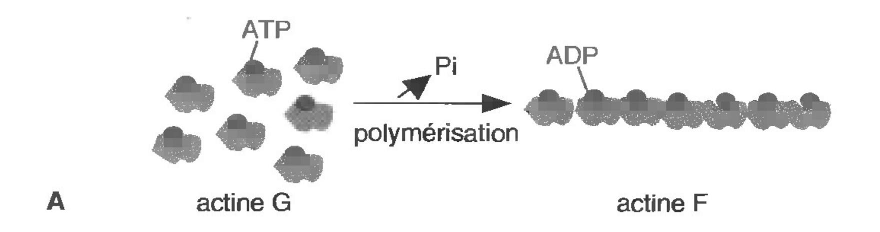
Par polymérisation il se forme une actine filamenteuse, **l'actine F.** La polymérisation se fait habituellement aux dépens d'énergie contenue dans l'ATP. La réaction permettant la polymérisation est la suivante :

$$\underset{\textit{actine globulaire}}{\text{Actine G-ATP}} \xrightarrow{\text{KCl (0,1 mol)}} \underset{\textit{actine filamenteuse}}{\text{Actine F-ADP}} + n\text{P}$$

Pour cette réaction l'ATP n'est pas indispensable, mais il augmente la vitesse de polymérisation.

Une fois polymérisée, l'actine F forme un filament de 1 mm de long, de 7 nm de diamètre, dans lequel 2 chaînes de molécules globulaires (environ 350 molécules d'actine G) sont enroulées en hélice *(fig. VI-1, B)*. Le pas de l'hélice est de 36 nm et on rencontre 13,5 molécules par tour d'hélice. Dans les muscles striés l'actine est souvent associée à d'autres protéines impliquées dans le contrôle de la contraction musculaire : la tropomyosine d'une part, une torsade de deux polypeptides formant des filaments appliqués dans le sillon de l'hélice d'actine, la troponine d'autre part, elle-même constituée de trois sous-unités *(fig. VI-1, B)*.

La chaîne d'actine est **polarisée.** Elle s'allonge à l'une des extrémités (extrémité +) et se dépolarise à l'autre extrémité (extrémité –). La vitesse de croissance de l'actine purifiée est habituellement 5 à 10 fois plus élevée à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (–). *La polarisation est unidirectionnelle,* la fibre d'actine fonctionnant comme un véritable « tapis roulant » ou une vis sans fin dans les conditions acellulaires. Dans les conditions



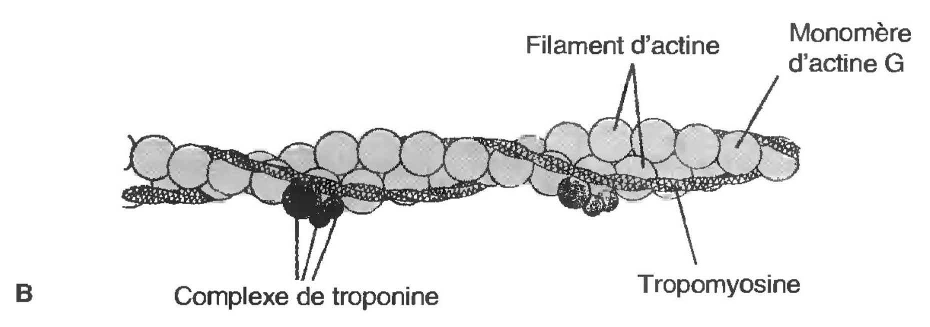


Fig. VI-1 : Actine G et actine F.
A) Polymérisation de l'actine globulaire.
B) Un microfilament et les protéines qui lui sont associées dans un filament fin de myofibrille.
(B: D'après la figure 14-11 de D.M. PRESCOTT. La cellule. Médecine-Sciences Flammarion, 1989.

cellulaires (pour une concentration en KCl de 0,15 mole), les filaments d'actine sont relativement stables. En effet la concentration critique, c'est-à-dire la concentration en actine nécessaire pour que les filaments ne se dissocient pas, est inférieure à la concentration d'actine cytoplasmique.

1.3. L'ACTINE EST LIÉE À DE NOMBREUSES AUTRES PROTÉINES

Il existe un grand nombre de protéines, le plus souvent présentes dans le cytosol, qui ont des effets sur la structure et l'assemblage de l'actine *(fig. VI-2)*. Ce sont :

– des **protéines de gélation** qui créent des liaisons souples entre les filaments d'actine ; elles jouent un rôle dans les transitions sol/gel et confèrent les propriétés de consistance du cytosol ;

– des **protéines de rassemblement** qui conduisent à l'organisation de faisceaux compacts d'actine (on connaît ainsi la *fimbrine* et la *villine*, toutes deux présentes dans les microvillosités, voir *fig. VI-6*) ;

– des **protéines de réticulation** qui organisent des ponts entre filaments d'actine relativement distants (200 nm) ;

– des **protéines de fragmentation**, comme la *gelsoline*, qui s'insèrent entre les sous-unités des filaments isolés et les coupent, et à l'inverse des **protéines de stabilisation** qui se lient sur la longueur des filaments d'actine et les protègent ;

– des **protéines de piégeage**, telle la *profiline*, qui empêchent l'actine G de polymériser ; elles forment un complexe avec l'actine monomérique ; elles contribuent à maintenir une réserve d'actine G dans la cellule ;

– des **protéines de coiffage** qui bloquent une extrémité des filaments ;

– des **protéines de mouvement** : la plus connue est la *myosine* qui se lie à l'actine et permet la contraction musculaire. Ce dernier aspect va être développé.

Le jeu de toutes ces protéines est très balancé et contrôlé. Il reste encore imparfaitement connu. Globalement ces protéines contrôlent l'organisation et l'activité de l'actine.

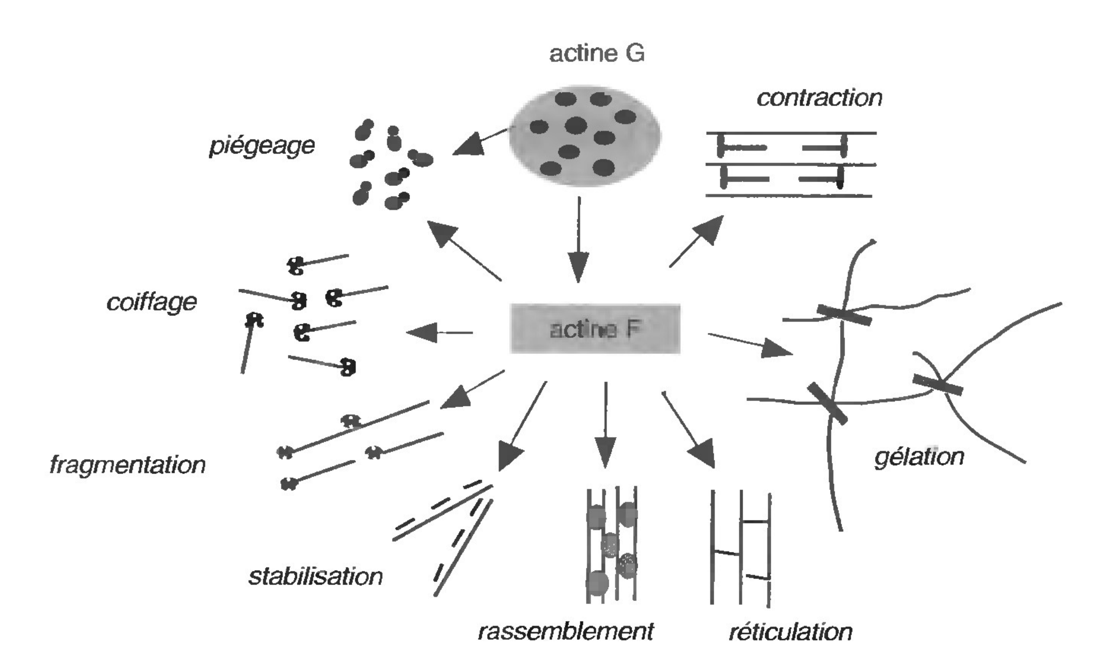


Fig. VI-2 : Effets de quelques protéines sur les microfilaments d'actine.

1.4. LES INTERACTIONS ACTINE/MYOSINE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES

A. *Structure de la myosine*

La myosine peut être extraite facilement du muscle squelettique (à partir des filaments épais). Il s'agit d'une très grosse protéine, de masse moléculaire voisine de 500 000 Da.

La molécule apparaît allongée sur une grande longueur (la queue) à l'extrémité de laquelle se trouvent 2 têtes *(fig. VI-3)*. La protéine a une structure quaternaire oligomérique. Elle est faite de 6 polypeptides : 2 chaînes lourdes, comportant 1 800 acides aminés, qui forment des hélices α enroulées en torsade tout au long de la queue et dont les extrémités N-terminales constituent la tête globulaire et 2 paires de chaînes légères associées à la tête globulaire. La structure de la molécule est

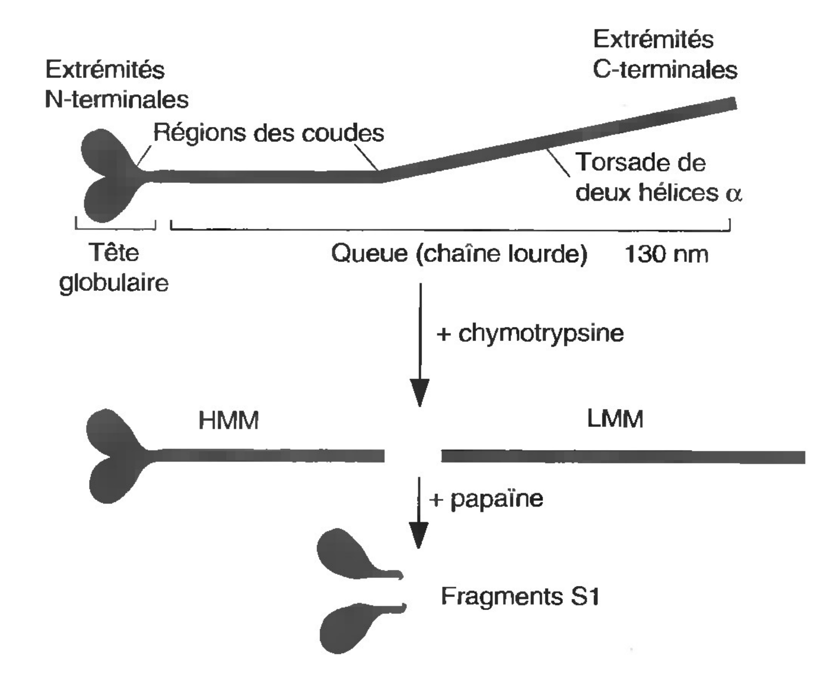


Fig. VI-3 : La myosine.
L'ensemble de la molécule est constitué de 2 chaînes lourdes et de 4 chaînes légères présentes au niveau de la tête globulaire. Une hydrolyse ménagée par la chymotrypsine coupe la molécule en une méromyosine lourde (HMM) et une méromyosine légère (LMM). Une action de la papaïne dissocie les fragments S1 comprenant l'extrémité NH_2 des chaînes lourdes + les chaînes légères.

bien connue. On peut en effet dissocier la myosine de façon précise à l'aide de protéases. Ainsi la chymotrypsine, en conditions ménagées, coupe la chaîne lourde au niveau d'un des coudes, donnant deux fragments distincts : la *méromyosine lourde* ou HMM *(**Heavy Meromyosine**)* et la *méromyosine légère* ou LMM *(**Light Meromyosine**)*. On peut aller plus loin et dégrader avec la papaïne la chaîne lourde de HMM. On obtient alors des fragments S1 contenant seulement la tête globulaire et les chaînes légères.

En conditions physiologiques les molécules de myosine ont tendance à s'agréger pour former des fibres : elles s'associent par leurs queues, les têtes se répartissant régulièrement tout autour. Dans les filaments épais des muscles striés plusieurs centaines de molécules de myosine s'organisent de telle sorte que les têtes sont projetées à l'extérieur des filaments *(fig. VI-4)*.

B. Les mécanismes de contraction des myofibrilles

Rappelons que dans les myofibrilles des cellules musculaires on distingue :

– les *myofilaments fins*, de 5 nm de diamètre, constitués d'actine à laquelle sont étroitement associées d'autres protéines *(fig. VI-1, B)* ;

– les *myofilaments épais*, de 10 nm de diamètre, constitués de myosine.

Lors de la contraction musculaire, les interactions entre l'actine et la myosine engendrent une force contractile en convertissant l'énergie chimique en un travail mécanique. L'énergie provient de l'ATP qui est hydrolysé et régénéré de façon permanente. ***C'est la myosine qui agit en tant qu'ATPase.***

Le mécanisme de la contraction des myofibrilles est complexe. Il fait intervenir le Ca^{2+} et de nombreuses protéines. Il est possible de proposer un schéma simplifié *(fig. VI-5)* montrant comment le déplacement des têtes de

Fig. VI-4 : Filament épais de myosine (cellule musculaire).
La région médiane lisse correspond à la région des queues de myosine assemblées. Le reste du filament est hérissé de têtes de myosine.



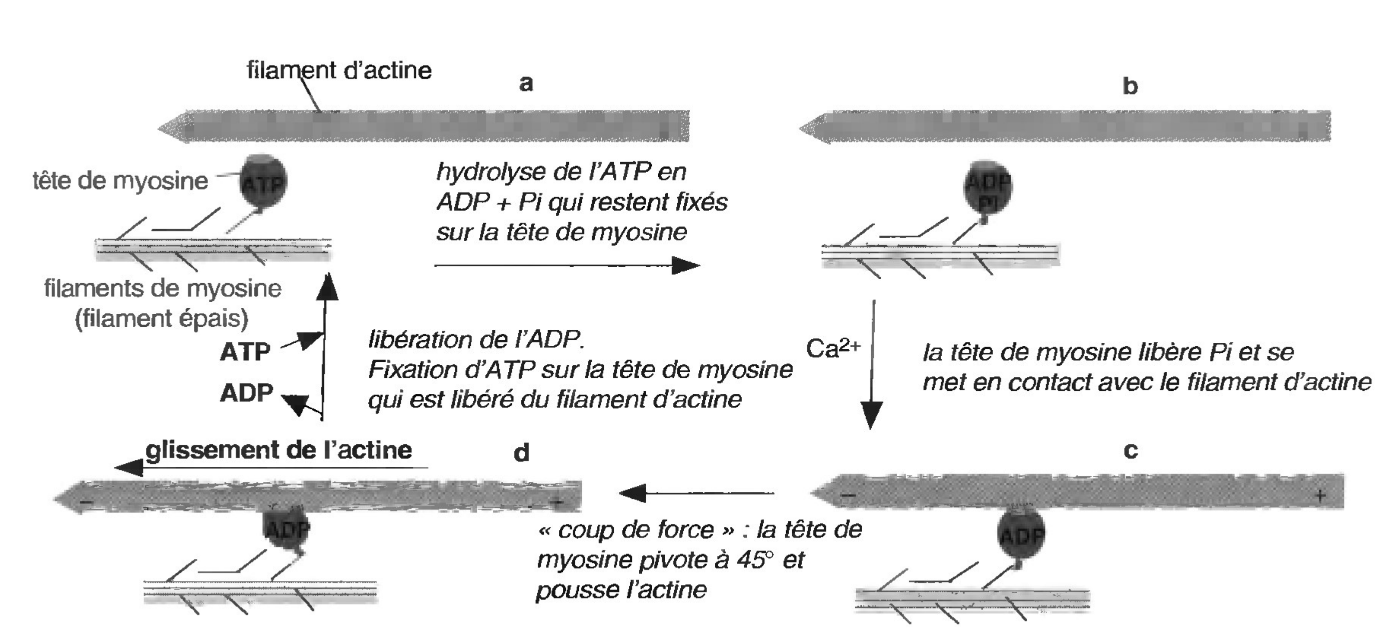


Fig. VI-5 : Interactions actine/myosine dans la contraction musculaire.
Schéma hypothétique mettant l'accent sur le rôle ATPasique des têtes de myosine générant la poussée du filament d'actine et le mouvement.

myosine le long d'un filament d'actine provoque un changement de conformation et un glissement du filament d'actine par rapport à la tête de myosine. À chaque cycle le filament d'actine est déplacé d'environ 7 nanomètres. Ce cycle est facilité par des protéines accessoires dont certaines permettent la régulation de la contraction par le calcium.

Chaque filament épais porte environ 500 têtes de myosine; chaque tête de myosine effectue 5 cycles par seconde au cours d'une contraction rapide. On en mesure l'efficacité mais aussi la dépense énergétique.

1.5. RÔLE DE L'ACTINE DANS LES CELLULES NON MUSCULAIRES

On trouve l'actine dans de nombreuses structures cellulaires où elle s'associe avec une grande variété de protéines. Les exemples les plus classiques sont les suivants.

A. *L'organisation des microvillosités*

Les microvillosités constituent la *bordure en brosse* de nombreuses cellules épithéliales, par exemple l'épithélium intestinal. Les filaments d'actine sont présents dans les innombrables replis de la membrane plasmique *(fig. VI-6)*.

De nombreuses protéines sont associées qui permettent l'ancrage des microfilaments sur la membrane plasmique et leur maintien en faisceaux. Ainsi les filaments d'actines sont-ils reliés en faisceaux parallèles par la fimbrine et la villine, cette dernière étant sous la dépendance des ions calcium pour sa stabilité et par voie de conséquence pour la stabilité de la microvillosité. Une autre protéine de 110 kilodaltons associée à la calmoduline organise aussi des ponts avec la membrane plasmique qui tapisse la microvillosité. Plus profondément, la fodrine relie elle aussi des faisceaux de microfilaments adjacents.

Le rôle du cytosquelette dans les microvillosités est surtout structural: il sert à stabiliser les microvillosités. Contrairement aux cellules musculaires, ces structures qui contiennent de l'actine ne sont pas contractiles.

Dans certains cas les microvillosités permettent, par leur polarisation, de percevoir la lumière (œil de calmar) ou le son (dans les cellules de l'oreille interne).

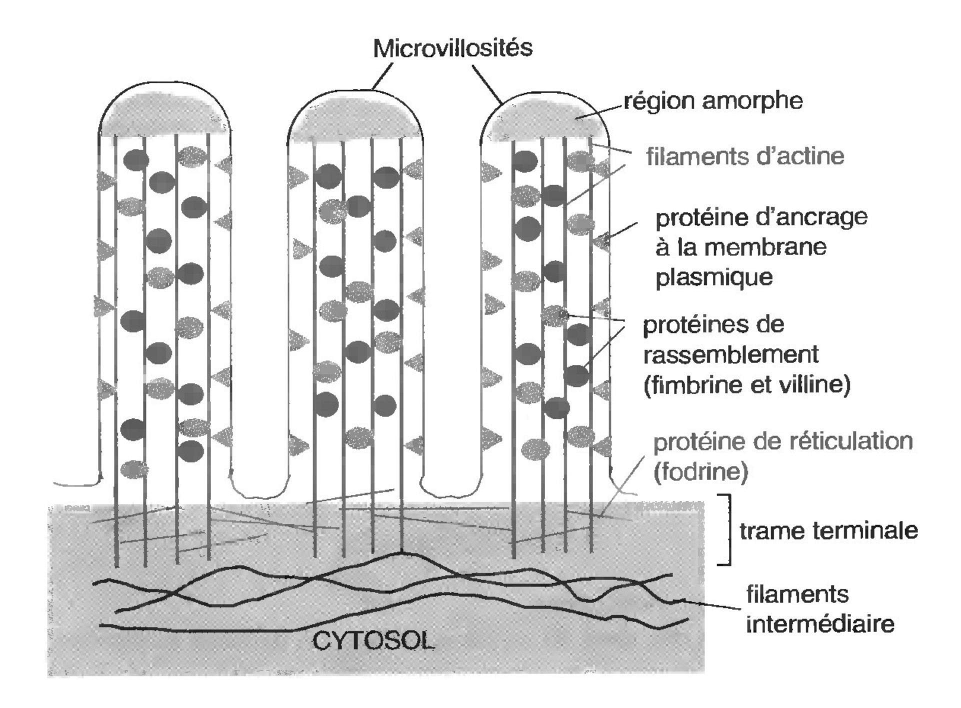


Fig. VI-6: Organisation schématique d'une microvillosité de cellule épithéliale de l'intestin de Vertébré.

Les filaments axiaux d'actine sont réunis par des protéines de rassemblement, la fimbrine et la villine. Les microfilaments sont reliés à la membrane plasmique par une protéine associée à une calmoduline. À la base, dans la trame terminale, des molécules de fodrine unissent les filaments d'actine.

B. Les microfilaments et la forme cellulaire

Les microfilaments prédominent dans la région corticale du cytoplasme et participent au contrôle de la forme cellulaire. On connaît par exemple assez bien l'organisation de la surface des hématies *(fig. VI-7)*. Un réseau bidimensionnel structuré mais souple est organisé sous la membrane plasmique qui explique bien que les hématies peuvent se déformer quand elles traversent des capillaires extrêmement fins. De courts fragments d'actine forment les nœuds d'un réseau constitué par une longue protéine de réticulation appelée la *spectrine* (elle a en effet été purifiée à partir de « fantômes » de globules rouges). Le réseau est lui-même accroché à des protéines transmembranaires par l'intermédiaire d'une autre protéine (*ankyrine*).

C. Les microfilaments et les mouvements cellulaires

Le rôle des microfilaments a été démontré dans les cellules où un courant cytoplasmique est important. C'est le cas des cellules végétales, telles les énormes cellules d'algues vertes *(Chara ou Nitella)* qui peuvent atteindre 5 cm de longueur et dans lesquelles un mouvement de **cyclose** entraîne les inclusions et les organites cytoplasmiques dans une rotation autour de la vacuole centrale *(fig. VI-8)*. Dans ces cellules on observe une accumulation d'actine à la base de la zone cytoplasmique corticale contenant les chloroplastes et qui est elle-même immobile. Le courant cytoplasmique serait enclenché par des molécules de type myosine glissant sur ces faisceaux d'actine.

Dans les cellules animales en culture qui peuvent se déplacer sur le support de culture et dans certains modèles faciles à manipuler, on a mis en évidence l'importance de l'actine dans les mouvements cellulaires. En utilisant des drogues ciblant spécifiquement l'actine, comme la **cytochalasine** qui empêche la polymérisation ou la **phalloïdine** qui empêche la dépolymérisation, on a pu montrer que ***les microfilaments d'actine peuvent créer la force du mouvement***. C'est particulièrement le cas des Amibes, des leucocytes des fibroblastes, toutes cellules douées de mouvements amiboïdes.

D. Les microfilaments et la division cellulaire

Dans les cellules animales la division cellulaire est caractérisée par la formation d'une **structure annulaire** caractéristique qui apparaît dans la partie médiane de la cellule au niveau du sillon de division (voir p. 397). Cet anneau est constitué d'un faisceau de filaments d'actine parallèles entre eux et associés à de la myosine.

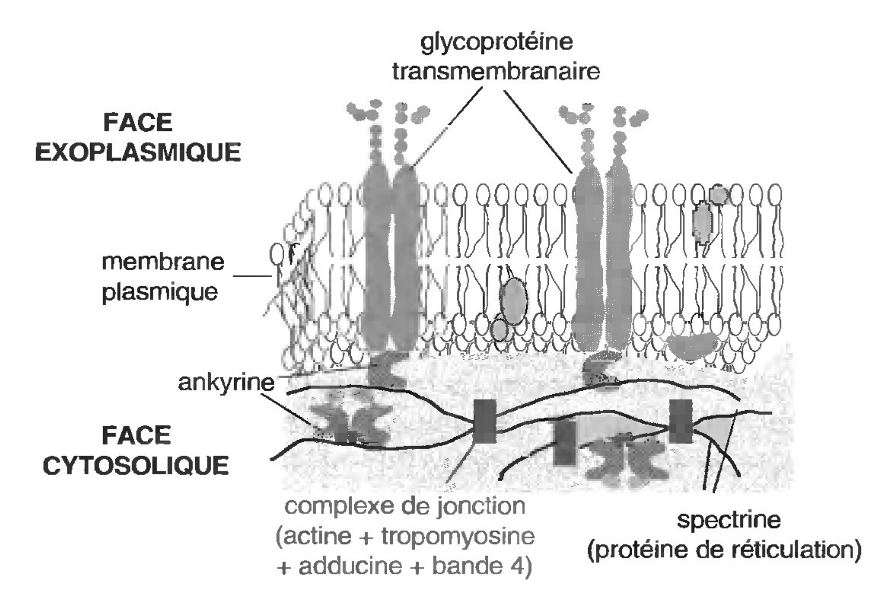


Fig. VI-7 : Organisation du cytosquelette sous-tendant la membrane plasmique du globule rouge.

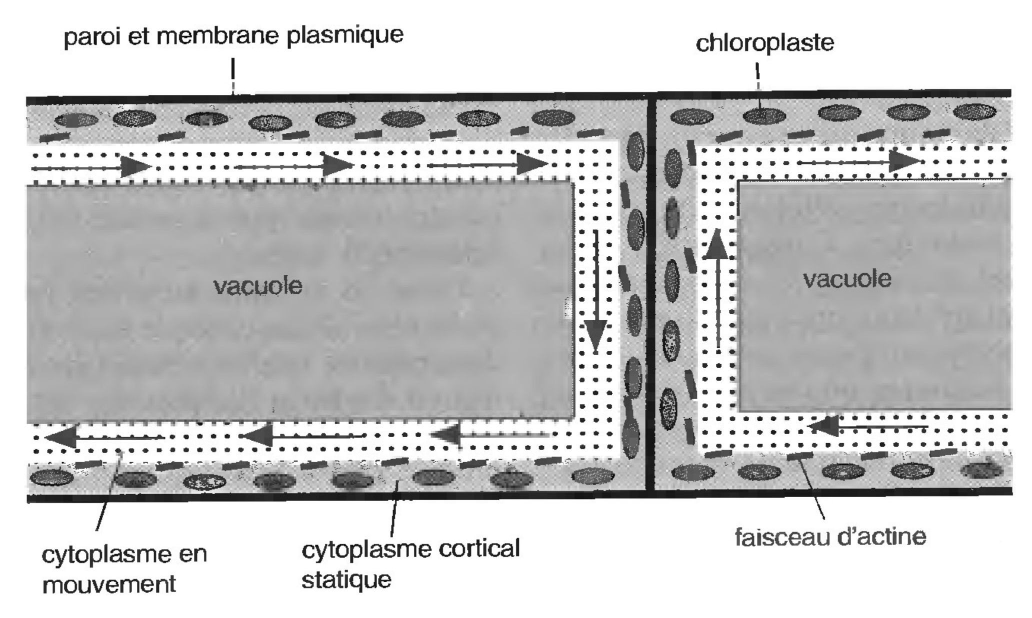


Fig. VI-8 : La cyclose chez les végétaux (cellules de l'algue Nitella).
Le flux de cytoplasme est indiqué par des flèches. La couche de cytoplasme cortical adjacente à la membrane plasmique, riche en chloroplastes, est immobile. À sa base elle est riche en faisceaux d'actine responsables du mouvement de la zone cytoplasmique sous-jacente riche en organites.

La force mécanique de la contraction provoque la constriction de la partie médiane et la séparation des cellules filles en télophase (cytodiérèse). Là encore, le mécanisme peut être bloqué par la cytochalasine.

2. LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

Découverts aussi dans les années 1970-1980, les filaments intermédiaires sont des *protéines fibreuses résistantes et stables*. Ils ne sont rencontrés que chez les Eucaryotes, la plupart ne sont connus que chez les vertébrés.

Les filaments intermédiaires sont les éléments les moins solubles de tout le cytosquelette. En microscopie électronique ils ont l'aspect de cordages et ils constituent dans la cellule une sorte de « panier » autour du noyau. Comme les autres éléments du cytosquelette ils peuvent être visualisés par immunocytochimie.

La composition des filaments intermédiaires varie selon les tissus. Les filaments intermédiaires sont même plus ou moins caractéristiques de certains tissus. On peut distinguer :

• Les *tonofilaments*

Les tonofilaments constituent des filaments de *kératine* présents surtout dans les cellules épithéliales. Ce sont des fibres de 8 nanomètres de diamètre. Les sous-unités élémentaires sont des chaînes torsadées à 3 brins faites de polypeptides en hélice. Ils sont ancrés sur les desmosomes, sortes de rivets qui forment des jonctions solides entre les cellules (voir p. 145).

On retrouve les tonofilaments dans les cellules ectodermiques des vertébrés supérieurs dans lesquelles ils s'accumulent. Lorsque les cellules meurent leur squelette subsiste formant une couche extérieure (ongles, cheveux).

• Les *neurofilaments*

Ce sont les filaments intermédiaires présents dans les neurones. Ils sont constitués par 3 types de protéines de masse moléculaire 70000, 150000 et 210000 Da. Ces trois protéines ont la particularité d'avoir une partie commune dans la séquence primaire ce qui permet de penser qu'elles auraient un gène ancestral commun.

• La *vimentine*

C'est une protéine de 57000 daltons typique des cellules mésenchymateuses. Elle peut être soit seule, comme dans les fibroblastes, soit associée à d'autres protéines comme dans les cellules gliales, c'est-à-dire dans le tissu conjonctif du cerveau. Elle est généralement associée aux microtubules dans ces cellules.

• La *desmine*

La desmine est trouvée dans les cellules musculaires (muscles striés, muscles lisses, muscle cardiaque).

• La *lamina nucléaire*

Les caractéristiques et l'importance des protéines de la lamina ont été analysées dans le chapitre concernant le noyau (voir p. 182).

Les molécules des filaments intermédiaires ont toutes une partie centrale en forme de baguette de 40 nm de long et dans laquelle les polypeptides sont semblables d'une espèce à l'autre. L'assemblage des filaments intermédiaires ne requiert ni ATP ni GTP, contrairement à celui des autres éléments du cytosquelette.

Les fonctions des filaments intermédiaires sont encore loin d'être parfaitement connues. Une des fonctions serait de contribuer à maintenir la position du noyau dans la cellule. Les filaments intermédiaires jouent probablement un ***rôle dans la distribution et le positionnement des organites.***

Un aspect important est le fait que les filaments intermédiaires peuvent servir de ***marqueurs de différenciation.*** Cette propriété est largement utilisée en anatomie-pathologie, en particulier pour rechercher l'origine des *tumeurs cancéreuses*, surtout dans le cas de métastases éloignées de tissu d'origine. En effet lorsque les cellules deviennent cancéreuses elles se dédifférencient; seuls les filaments intermédiaires restent longtemps organisés et permettent ainsi d'identifier le type cellulaire à partir duquel le cancer s'est formé.

L'analyse des filaments intermédiaires peut aussi révéler des malformations congénitales. Par exemple c'est l'accumulation de filaments intermédiaires dans les neurones qui permet de détecter des cas de démence sénile. C'est l'accumulation de cytokératine dans les cellules hépatiques qui permet de détecter la cirrhose du foie...

3. LES MICROTUBULES

Les microtubules sont les plus gros éléments du cytosquelette. Ils sont présents seulement chez les Eucaryotes. Ils sont constitués de tubes cylindriques de 25 nanomètres de diamètre environ. Leur longueur est variable. Ils sont toujours rectilignes et ne présentent jamais de ramifications.

On distingue deux types de microtubules :

– les **microtubules labiles:** ils sont très difficiles à conserver; ils sont souvent détruits par les agents de fixation chimique ou par les basses températures. On les trouve dans le cortex des cellules, aux pôles des cellules en division, autour des centrioles dans les cellules animales ;

– les **microtubules stables**: ils sont beaucoup plus faciles à conserver. Ce sont des édifices compliqués dont les plus typiques constituent les **centrioles** et l'**axonème** des cils et des flagelles.

3.1. COMPOSITION CHIMIQUE ET ARCHITECTURE MOLÉCULAIRE

L'isolement des microtubules est relativement facile à partir des fuseaux des cellules en cours de division.

Les protéines qui composent les microtubules sont les **tubulines**, protéines très conservées. Par électrophorèse on peut séparer deux tubulines, respectivement la **tubuline α** et la **tubuline β*.** Ce sont des protéines globulaires de masse moléculaire 55000 Da, qui existent en quantité égale :

$$\text{tubuline } \alpha = \text{tubuline } \beta$$

Ces tubulines sont libres dans la cellule sous forme de dimères α-β. Les microtubules sont le résultat d'une polymérisation de ces dimères et de leur association à d'autres protéines, dites protéines associées, les MAP *(Microtubule Associated Proteins)* : les microtubules sont donc des **hétéropolymères**.

La formation d'un microtubule se fait par polymérisation. Les tubulines s'associent en formant un *protofilament* de 5 nm de diamètre contenant alternativement des monomères α ou β. Treize protofilaments forment les parois d'un cylindre creux, le *microtubule*. Dans le microtubule les dimères des protofilaments voisins présentent un léger décalage, ce qui lui donne un aspect spiralé *(fig. VI-9)*.

Les dimères ont des sites de liaison pour des nucléotides (un GTP ou un GDP). Ils ont aussi des sites de liaisons pour des alcaloïdes comme la *colchicine*, la *vinblastine* ou la *podophylline*. On verra que ces alcaloïdes sont des agents dépolymérisants des microtubules.

3.2. POLYMÉRISATION ET DÉPOLYMÉRISATION DES MICROTUBULES

Dans les cellules il existe en permanence un équilibre entre les dimères libres, qui constituent la réserve cytoplasmique, et les microtubules assemblés. Les microtubules sont des structures ***polarisées*** et dynamiques dans lesquelles on distingue deux extrémités : une *extrémité (+)* qui correspond au pôle où se fait la polymérisation et une *extrémité (–)* qui correspond au pôle où se fait la dépolymérisation. Une expérience simple effectuée *in vitro* permet de montrer que les deux extrémités d'un microtubule-amorce se comportent de façon différente lors d'addition ou de perte de tubuline dans le milieu : **les microtubules grandissent et se raccourcissent préférentiellement à l'une de leurs extrémités, l'extrémité (+)** *(fig. VI-10)*.

D'autres expériences *in vitro* ont aussi révélé que, si l'extrémité (–) est protégée, le microtubule va s'allonger. Dans la cellule les microtubules s'allongent à partir de régions déterminées où les extrémités (–) sont ancrées : ce sont les **centres organisateurs**. Dans les cellules animales en interphase le centre organisateur est le matériel péricentrio-

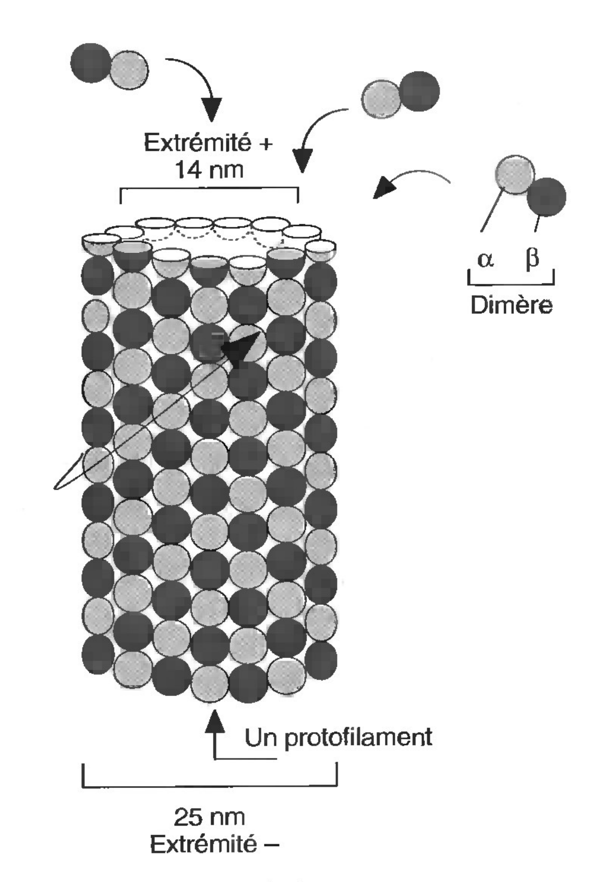


Fig. VI-9 : Les microtubules.
Reconstitution schématique d'un microtubule assemblé à partir de dimères de tubuline.

* Un troisième type de tubulines, les tubulines γ, ont été identifiées dans les centres organisateurs de microtubules (voir p. 385).

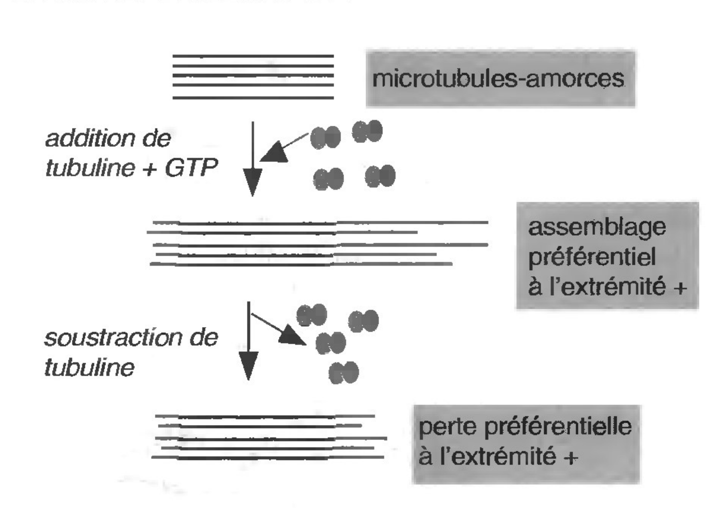


Fig. VI-10: Expérience montrant que les microtubules grandissent et se raccourcissent de préférence à l'extrémité (+).
Des fragments de microtubules de flagelles (traits noirs) peuvent servir d'amorces à des expériences de polymérisation et de dépolymérisation. Les microtubules synthétisés *in vitro* (traits rouges) sont reconnaissables au microscope électronique par leur organisation plus irrégulière. Lors de l'addition de dimères de tubuline on peut repérer que l'assemblage se fait surtout à l'extrémité (+) ; de même la soustraction des dimères de tubuline provoque un désassemblage deux fois plus rapide à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (–).

laire. Dans les cellules en division ce sont les kinétochores et surtout les 2 centres péricentriolaires (voir chap. IX, 2e partie).

Les microtubules sont très sensibles à des agents chimiques. C'est le cas en particulier de la colchicine, alcaloïde puissant extrait des colchiques, qui a la propriété de se fixer sur les dimères de tubuline en les bloquant dans le cytosol. La polymérisation du microtubule est alors empêchée, un déséquilibre se produit en faveur de la dépolymérisation et les microtubules labiles finissent par disparaître. Cette propriété est à la base de la recherche d'**agents antimitotiques** dans les traitements du cancer. On sait que les cellules cancéreuses ont la particularité de se diviser activement; un moyen de lutte est donc d'inhiber la formation du fuseau de division.

3.3. RÔLES PHYSIOLOGIQUES

A. *Les microtubules labiles permettent de maintenir la forme cellulaire*

Ce sont les microtubules qui subsistent en dehors des divisions cellulaires. Ils jouent véritablement un rôle de squelette pour la cellule.

Une expérience permet de confirmer ce rôle *(fig. VI-11)*. Elle est effectuée à partir de **myoblastes**, c'est-à-dire de cellules musculaires. Des myoblastes indifférenciés sont obtenus à partir d'une queue de têtard qui a été coupée et qui régénère des tissus. Les cellules se différencient, fusionnent et constituent alors des **myotubes** allongés où l'on peut repérer des microtubules tous orientés par rapport à l'axe cellulaire, entre lesquels se forment les myofibrilles parallèles (actine + myosine) *(fig. VI-11, A)*.

Lorsque la même expérience est effectuée en présence de colchicine (le têtard est placé dans de l'eau contenant cet alcaloïde) on s'aperçoit que les myotubes ne sont plus allongés. Les **myosacs** ainsi obtenus ne renferment pas de microtubules et à l'intérieur les myofibrilles s'organisent dans tous les sens: elles ne sont plus du tout parallèles *(fig. VI-11, B)*.

Dans les cellules végétales les microtubules contribuent aussi au maintien de la forme cellulaire. Un cytosquelette cortical est présent dans ces cellules sous la membrane plasmique qui est facilement détectable avec les techniques d'immunofluorescence *(fig. VI-12)*. Lorsque ces cellules sont cultivées en présence de colchicine, elles perdent totalement leur forme polarisée et deviennent souvent sphériques.

B. *Les microtubules jouent un rôle dans les mouvements cellulaires*

L'importance des microtubules dans les mouvements cellulaires peut être connue à partir d'expériences utilisant des drogues bloquant leur polymérisation. Elles montrent que l'absence des microtubules s'accompagne d'un arrêt des mouvements cellulaires.

Depuis quelques années le rôle de *protéines motrices* associées aux microtubules est de plus en plus souligné. Ainsi une *kinésine* a pu être isolée à partir de cellules nerveuses. C'est une protéine faite de 4 polypeptides: une

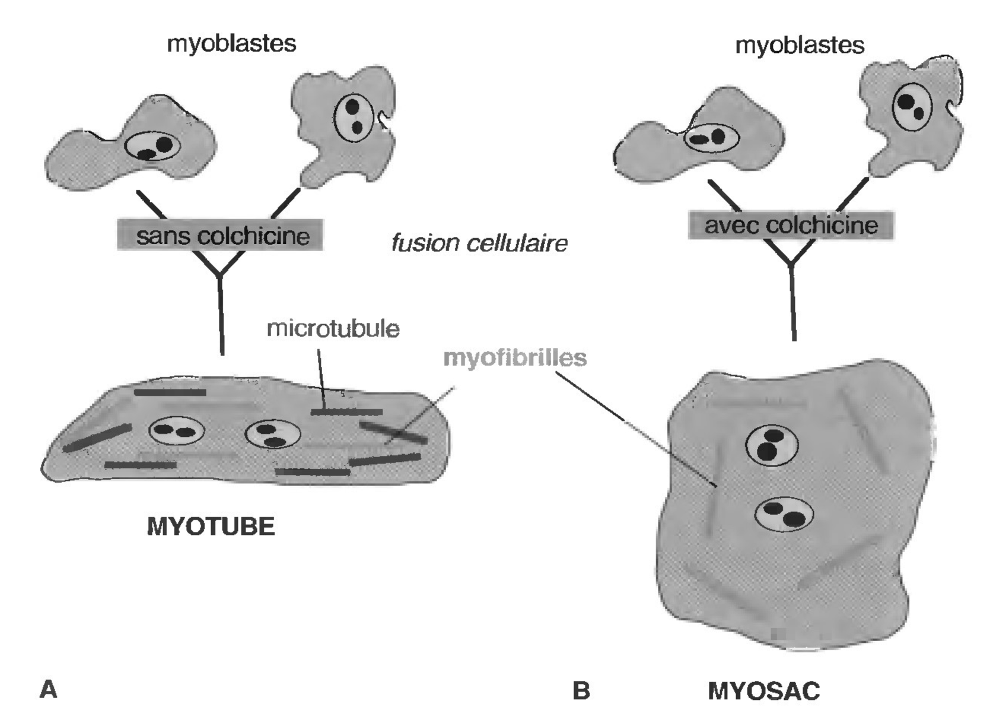


Fig. VI-11 : Les microtubules et la forme cellulaire.
A) Formation de myotube allongé et polarisé à partir de cellules indifférenciées.
B) Formation de myosac en présence de colchicine (absence de microtubules).

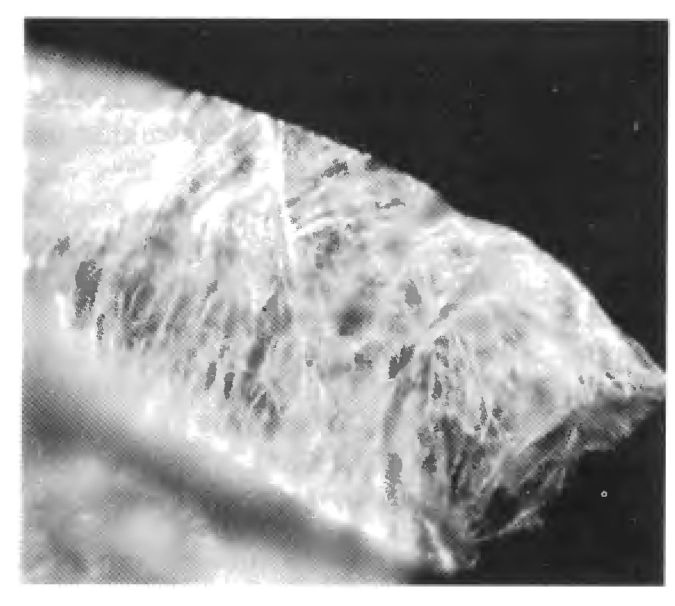


Fig. VI-12 : Visualisation des microtubules corticaux dans une cellule végétale par immunofluorescence.
Cellule de parenchyme cortical d'un hypocotyle de soja. Le tissu, d'abord perméabilisé pour permettre le passage des anticorps à travers la paroi et le plasmalemme, a été mis en contact avec un anticorps anti-tubuline détectable par un marqueur fluorescent. Les microtubules apparaissent ici organisés sous la surface avec une organisation plus ou moins hélicoïdale.
(Cliché B. SATIAT-JEUNEMAITRE.)

extrémité peut se lier à des vésicules (grâce à des récepteurs), l'autre extrémité peut se lier au microtubule. La *figure VI-13* montre comment une protéine de type kinésine pourrait intervenir dans le mouvement intracellulaire de vésicules (des vésicules de sécrétion par exemple) le long des microtubules ou dans le mouvement des microtubules eux-mêmes. Les mécanismes exacts permettant ce mouvement sont encore mal connus. Outre les kinésines, il existe une autre classe de protéines motrices dépendantes de microtubules : ce sont les dynéines cytoplasmiques, probablement impliquées dans le déplacement des organites et dans la mitose (voir p. 394).

C. Les microtubules sont impliqués dans la division cellulaire

Les microtubules constituent au cours de la mitose les fuseaux de division. Comme cela sera détaillé dans le chapitre IX, la séquence des événements est dominée par la formation et l'activité de l'appareil mitotique.

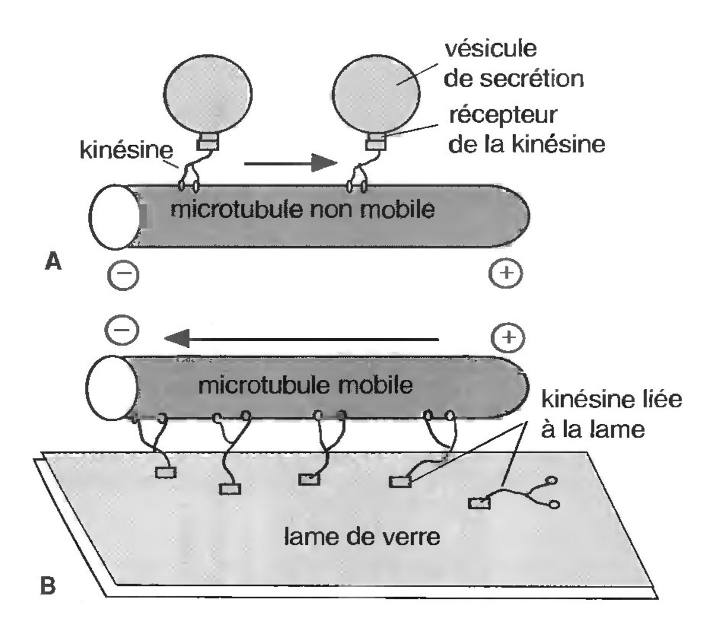


Fig. VI-13 : Hypothèses montrant le rôle de la kinésine comme « protéine motrice » des microtubules.
A) Transport de vésicules le long d'un microtubule de l'extrémité (–) à l'extrémité (+). La vésicule est attachée à la kinésine qui « glisse » le long du microtubule immobile. L'ATP est indispensable pour un tel déplacement.
B) Transport d'un microtubule par l'intermédiaire de la kinésine en présence d'ATP. Les molécules de kinésine sont liées à la lame de verre donc immobilisées. Elles tendent à progresser vers l'extrémité (+) du microtubule qui « glisse » à la surface de la lame de verre.
(Redessiné à partir de la figure 21-25 de J. DARNELL, H. LODISH et D. BALTIMORE. Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck Université, Bruxelles, 1993.)

3.4. LE CAS DES MICROTUBULES STABLES

Ce sont les microtubules entrant dans l'organisation de structures très complexes et organisées : les *centrioles*, les *axonèmes*, armatures pluritubulaires des cils et des flagelles.

A. Les centrioles

Ils constituent dans les cellules animales deux cylindres perpendiculaires, présents en interphase à proximité du noyau. Ils correspondent à ce que l'on nomme le *diplosome* (du grec *diplos* double, *soma* corps) en microscopie optique.

Voir en page 384 la *figure IX-26* qui montre la structure caractéristique d'un centriole, formé de 9 *triplets* de tubules (soit 9 groupes de 3 microtubules associés sur toute leur longueur) ; ils forment un cylindre et sont entourés d'un matériel *péricentriolaire*.

Au moment de la division cellulaire les centrioles se dédoublent et les deux groupes de centrioles se disposent aux deux pôles du fuseau. Les centrioles ne sont pas indispensables à la division cellulaire (les cellules végétales n'en possèdent pas) : il semble toutefois qu'ils accélèrent la polymérisation de la tubuline favorisant ainsi la construction du fuseau.

Dans les cellules ciliées les centrioles constituent aussi le *corpuscule basal* ou - *cinétosome* qui se trouve à la base de chaque cil.

B. Les axonèmes des cils et des flagelles

Les cils et les flagelles sont des digitations de la surface cellulaire, recouvertes par la membrane plasmique. Il n'y a pas de différence fondamentale entre les cils et les flagelles. On considère généralement que les cils sont courts alors que les flagelles sont plus longs. Les cils assurent la protection des épithéliums. Les flagelles sont responsables des déplacements des spermatozoïdes et de nombreux protistes.

L'*axonème* constitue le faisceau de microtubules orientés parallèlement dans l'axe du flagelle. Son architecture est complexe. Elle comprend une paire de tubules axiaux constituant la gaine centrale et une gaine annulaire formée de 9 groupes de tubules, les doublets. Le flagelle s'insère dans le cytoplasme au niveau d'un *corpuscule basal*, relié à la membrane plasmique par des fibres de transition *(fig. VI-14)*.

L'organisation moléculaire de l'axonème est complexe et implique, en plus des tubulines, de nombreux polypeptides. Un schéma peut en être proposé *(fig. VI-15)* qui montre la localisation des bras de *dynéine* (protéine à propriété ATPasique), des ponts de *nexine* (protéine à propriétés élastiques) entre les doublets périphériques adjacents, des *fibres rayonnantes* joignant les microtubules périphériques à la gaine centrale.

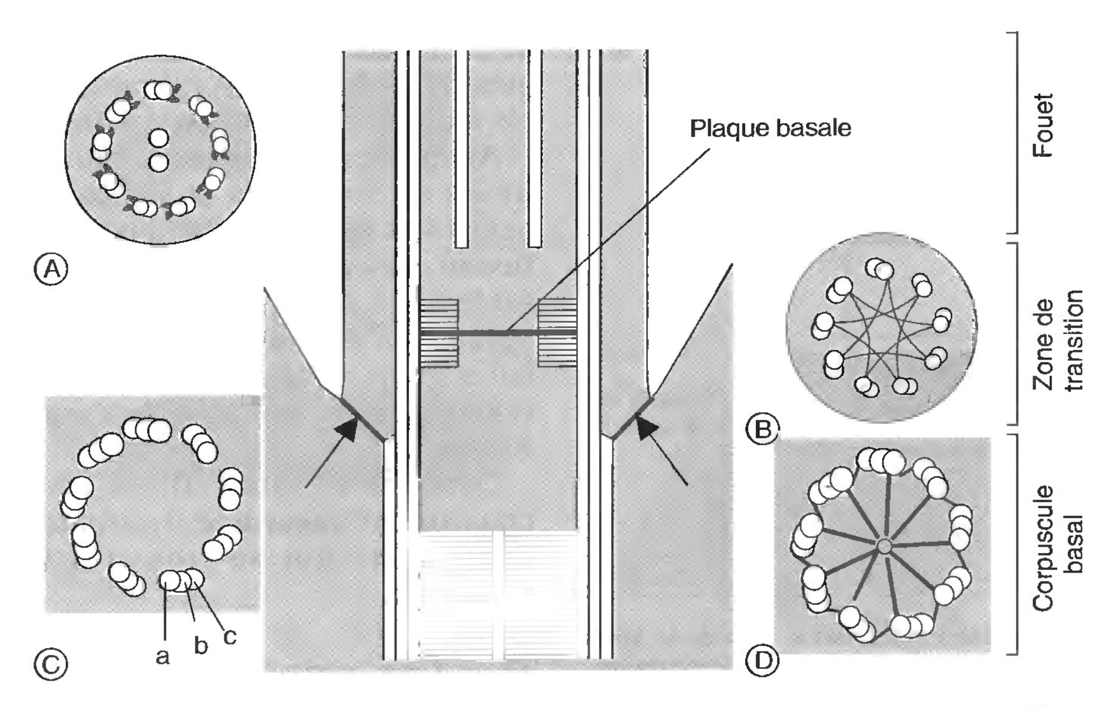
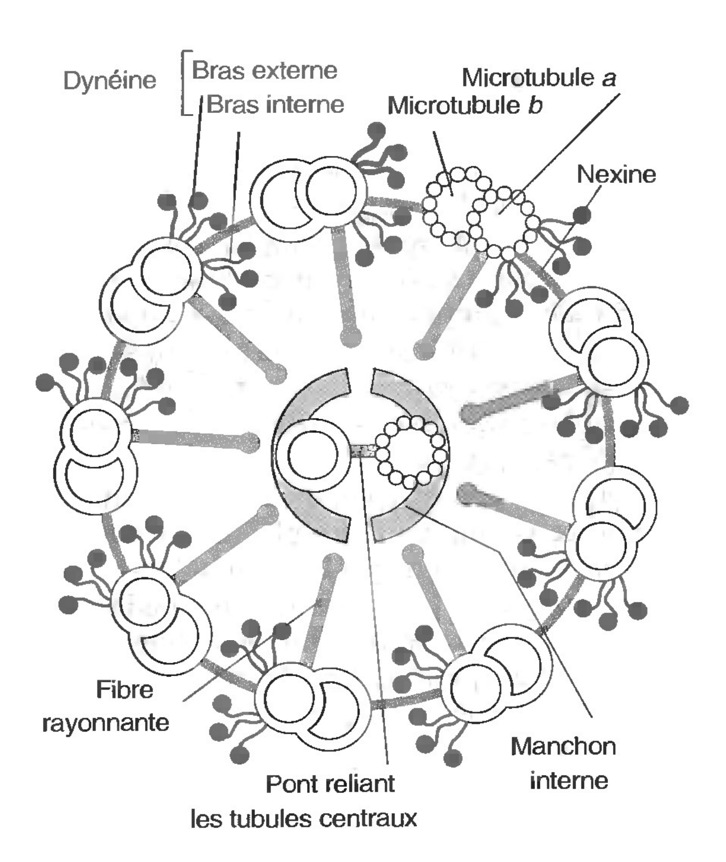


Fig. VI-14 : Structure d'un flagelle, coupe longitudinale axiale et sections transversales à différents niveaux. L'*axonème*, constitué par 20 microtubules (9 paires périphériques et deux tubules centraux, A), s'insère dans le corps cellulaire au niveau du *corpuscule basal*. La partie profonde de celui-ci (D) présente une structure en *roue de charrette* car 9 triplets périphériques sont reliés à un tubule central unique par des *stries rayonnantes*. La partie distale (C) a une structure de type centriolaire. Au niveau B seuls les doublets périphériques sont présents ainsi qu'un disque de matériel dense, la *plaque basale*. Le corpuscule basal est relié au plasmalemme par des fibres de transition (flèches).

(Reproduction de la fig. I-39 de D. ROBERT & A.M. CATESSON. Biologie végétale. Tome 2. Organisation végétative, Doin, 2000.)



Nous n'entrerons pas dans le détail des différents types de mouvements des flagelles et des cils. Les mouvements sont directement induits par les microtubules de l'axonème. Ils se font aux dépens de l'ATP, les dynéines étant responsables de son hydrolyse. Dans les flagelles le battement se propage, de la base vers le sommet, sous forme d'ondes sinusoïdales successives dans un seul plan *(fig. VI-16, A)*. On peut aussi repérer des battements de type ciliaire, se rabattant comme un fouet le long du corps cellulaire *(fig. VI-16, B)*.

Fig. VI-15 : Représentation schématique d'une coupe transversale d'axonème flagellaire.

(Reproduction de la figure I-40 de D. ROBERT et A.M. CATESSON. Biologie végétale. Tome 2. Organisation végétative. Doin, 2000)

Fig. VI-16 : Battement du flagelle.
Positions successives occupées par le flagelle.
A) Battement de type flagellaire.
B) Battement de type ciliaire.
(Reproduction de la figure I-43 de D. ROBERT et A.M. CATESSON. Biologie végétale. Tome 2. Organisation végétative. Doin, 2000. – D'après F. MARANO, 1989.)

A Cinétosome 1 2 3 4 5 B

CONCLUSION

A priori le terme cytosquelette évoque peut-être l'idée de structures relativement figées. Les faits montrent qu'il n'en est rien. Au contraire, plus la connaissance du cytosquelette se précise, plus elle contribue à changer la vue que les biologistes pouvaient avoir du cytoplasme. ***Le cytosquelette est responsable de la forme de la cellule, de sa division, du mouvement des organites, mais il est aussi responsable de l'organisation spatiale nécessaire pour toutes les transformations métaboliques qui se passent dans le cytosol. Par sa capacité à s'organiser et à se réorganiser très rapidement on peut dire que le cytosquelette confère au protoplasme une organisation dynamique.***

CHAPITRE VII

Compartiments intracellulaires : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes

Le cytosol des cellules correspond à une organisation très complexe. Chez les Eucaryotes, le cytosol représente environ 50 à 60 % du volume cellulaire et une partie importante des réactions du métabolisme s'y déroule. Le cytosol renferme par ailleurs une grande variété d'organites et de vésicules intracytoplasmiques entourées de membranes. Contrairement aux Procaryotes où de très nombreuses fonctions s'effectuent sur la membrane plasmique, la surface du plasmalemme des Eucaryotes n'est pas assez grande pour localiser toutes les enzymes nécessaires et assurer de nombreuses fonctions vitales. D'où la nécessité de **compartiments** qui se sont fonctionnellement différenciés et qui permettent à la cellule Eucaryote d'**effectuer simultanément des réactions chimiques incompatibles**. Cette organisation évite un mélange des enzymes et une chimie chaotique. Ils permettent aussi de rapprocher les macromolécules susceptibles d'interagir (substrats et enzymes par exemple), ce qui est évidemment un avantage en terme de métabolisme cellulaire (voir p. 415). *Dans ce chapitre il ne sera par conséquent question que de cellules Eucaryotes.*

Si les compartiments présentent une apparente discontinuité dans la cellule, ils n'en sont pas moins interdépendants pour ce qui est de leur fonctionnement. C'est la raison pour laquelle les données concernant les principaux compartiments endomembranaires ont été réunies dans un même chapitre. On pourra ainsi dégager leur importance relative et leur connexion dans les voies où ils sont impliqués :

– les voies de l'**industrie exportatrice** : il s'agit des mécanismes de synthèse, sécrétion et exocytose, qui sont assurés par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et ses dérivés ;

– les voies de l'**industrie importatrice** et/ou **lytique** : il s'agit des mécanismes de « digestion » intracellulaire, qui sont assurés par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et surtout par le compartiment terminal que constituent les lysosomes dans le cas des cellules animales ou la vacuole dans le cas des cellules végétales.

1. ORGANISATION MORPHOLOGIQUE DES COMPARTIMENTS

Malgré leur apparente diversité, les compartiments endomembranaires présentent une même organisation de base : ils correspondent en effet toujours *à une cavité limitée par une membrane simple.*

1.1. ASPECTS CYTOLOGIQUES

A. Au microscope optique

À cause de leur petite taille les compartiments endomembranaires sont difficiles à caractériser à l'échelle du microscope optique. Le **réticulum endoplasmique** en particulier ne peut être décrit précisément : comme il a été vu dans le chapitre concernant la traduction, ce compartiment ne devient visible que lorsqu'il est très abondant et qu'une masse de ribosomes lui est associée, par exemple dans les cellules à activité de synthèse particulièrement forte.

La découverte de l'**appareil de Golgi** est relativement ancienne et a donc été réalisée à l'aide du microscope optique. En 1898, Camillo GOLGI, un biologiste italien, spécialiste du système nerveux, réalisait des imprégnations à l'aide de métaux lourds (osmium, argent) dans des cellules du cervelet de la chouette. Après réduction de ces métaux il observait une précipitation qui se localisait toujours au même endroit dans les cellules au niveau d'un organite dans lequel on pouvait repérer une zone chromophobe et une zone chromophile. L'appareil de Golgi était décrit mais la résolution du microscope optique était telle que la discussion sur son existence et surtout son rôle est restée longtemps ouverte entre les biologistes, jusqu'à l'avènement du microscope électronique.

La découverte des **lysosomes** est beaucoup plus récente. Elle est surtout inverse de celle des autres organites, dans la mesure où les lysosomes ont été découverts par les méthodes biochimiques avant d'être décrits par les méthodes morphologiques. En 1949, DE DUVE, en recherchant des activités phosphatasiques acides dans des fractions cellulaires de foie, postulait l'existence d'une fraction correspondant à des compartiments clos et enrichis en hydrolases acides ; cette fraction était récupérée à des vitesses de sédimentation voisines de celles permettant d'obtenir la fraction mitochondriale. Difficiles à observer au microscope optique en raison de leur petite taille, ces organites ne furent décrits qu'une dizaine d'années plus tard au microscope électronique.

B. Au microscope électronique

a. Le réticulum endoplasmique

En 1950, Keith PORTER découvrait un système de membranes intracellulaires qu'il nomma **réticulum endoplasmique** (du latin *reticulum*, réseau ; il s'agit d'un réseau à l'intérieur du cytoplasme) en raison de sa forme. Peu d'années après, Georges PALADE montrait que des grains (les grains de Palade ou les futurs ribosomes), étaient associés à ce réseau dans certaines régions. Le réticulum endoplasmique était décrit alors comme un ensemble complexe de membranes délimitant des cavités closes, ou *citernes*, et comportant ainsi deux faces : la *face hyaloplasmique*, c'est-à-dire celle tournée vers le cytosol, et la *face luminale*, ou *intracisternale*, c'est-à-dire celle tournée vers la lumière des citernes *(fig. VII-1)*. Il était aussi montré que le réticulum endoplasmique est en continuité avec l'enveloppe nucléaire.

Le réticulum endoplasmique existe sous deux formes qui correspondent à deux aspects fonctionnels :

– le **réticulum endoplasmique rugueux** ou **granulaire (RER**, de l'anglais *Rough Endoplasmic Reticulum* ; *rough* = rugueux). Il porte des ribosomes sur sa face hyaloplas-

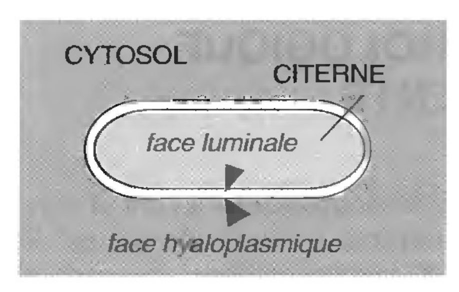


Fig. VII-1 : Représentation schématique du réticulum endoplasmique.
Il s'agit d'un compartiment clos comportant deux faces membranaires fonctionnellement différentes.

mique. Il est en continuité avec l'enveloppe nucléaire, elle aussi parsemée de ribosomes;

– le **réticulum endoplasmique lisse** ou **agranulaire** (**SER** de l'anglais ***Smooth Endoplasmic Reticulum***; *smooth* = lisse). Ses membranes ne portent pas de ribosomes. Il peut être en continuité avec le RER.

Qu'il soit lisse ou rugueux le réticulum endoplasmique est morphologiquement très variable, et ceci selon le type cellulaire où il est observé. Aucune description générale n'est donc possible. De façon très schématique on peut toutefois distinguer *(fig. VII-2)*:

– de fins tubules très contournés et anastomosés, rencontrés surtout dans les cellules où le SER est très abondant, telles les cellules où le métabolisme lipidique est très actif (les adipocytes, les hépatocytes par exemple), les cellules qui fabriquent des hormones (celles des testicules), les cellules musculaires (dans ce dernier cas le réticulum endoplasmique, très complexe, se nomme réticulum sarcoplasmique);

– des vésicules globulaires;

– des sacs aplatis formant de véritables nappes parallèles. C'est le cas des cellules où le RER est très abondant, telles les cellules élaborant des protéines ou des glycoprotéines (cellules acineuses du pancréas, cellules du plasma sécrétrices d'anticorps, par exemple).

La quantité de réticulum endoplasmique peut être très importante dans une cellule. À titre d'exemple 1 gramme de foie contient à peu près 10 m^2 de réticulum endoplasmique. Une cellule hépatique dont le diamètre est environ de 20 µm, contient 40 000 μm^2 de réticulum endoplasmique.

b. L'appareil de Golgi

L'**appareil de Golgi** a aussi une morphologie variable. Il est constitué par l'ensemble de plusieurs éléments appelés **dictyosomes** (du grec *dictuon*, filet). Chaque dictyosome comprend un empilement de 4 à 8 saccules aplatis

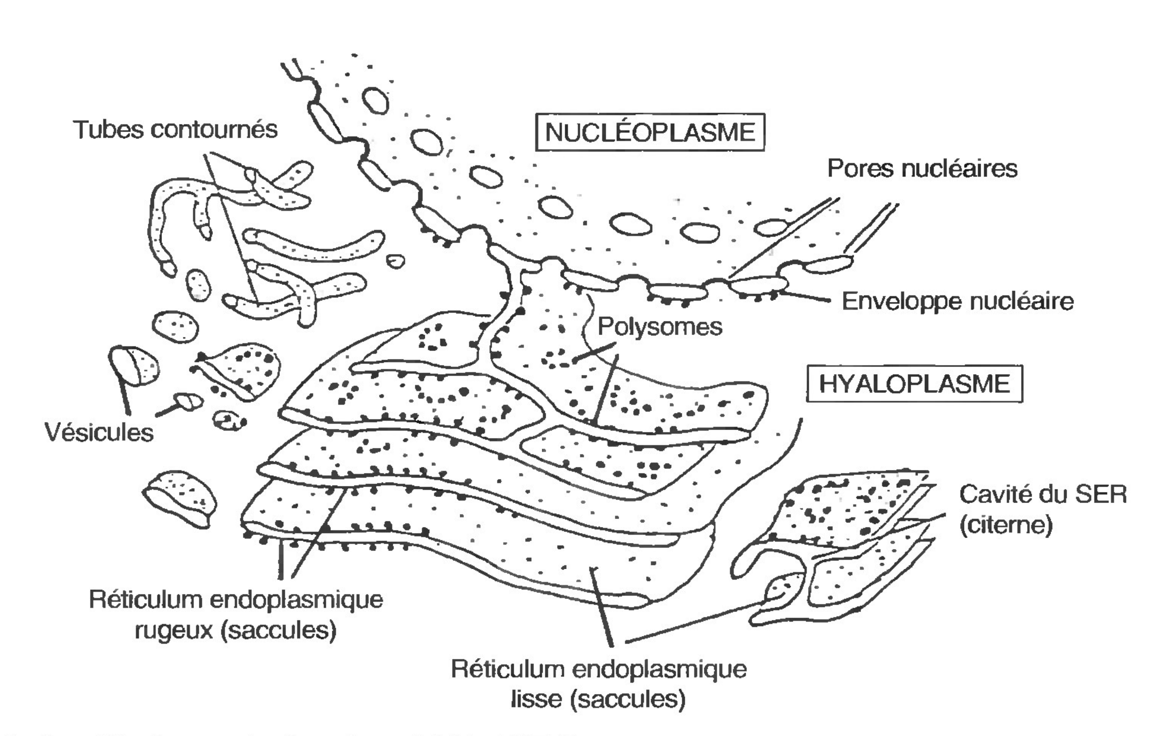


Fig. VII-2 : Le réticulum endoplasmique (RER et SER).

en forme de disque dont les extrémités forment des ampoules élargies. L'organisation de l'appareil de Golgi est différente selon qu'il appartient à une cellule animale ou une cellule végétale. Dans les cellules animales les dictyosomes sont souvent associés formant un véritable réseau *(fig. VII-3, A)*. Dans les cellules végétales les dictyosomes sont le plus souvent isolés, donc plus difficiles à observer dans la mesure où ils ne forment pas un appareil aussi organisé que dans les cellules animales.

Même si tous les éléments qui vont être décrits – de façon un peu schématique – ne sont pas toujours identifiables sur les documents (en raison des artefacts de préparation, de l'état de différenciation des cellules, et de leur état physiologique...) on peut reconnaître dans chaque dictyosome les sous-compartiments suivants *(fig. VII-3)*:

– un **compartiment *cis*,** tourné du côté du RER avec lequel il établit des interrelations par des vésicules de transition. Il correspond à la *face de formation* des dictyosomes souvent décrite dans les ouvrages;

– un **compartiment médian**, qui comporte quelques saccules régulièrement empilés (le nombre dépend du type cellulaire, il est souvent voisin de 5). Les saccules sont souvent très fenestrés;

– un **compartiment *trans*,** prolongé le plus souvent par de très nombreuses vésicules, dont certaines peuvent être recouvertes de clathrine ou d'autres protéines selon la destination d'adressage (voir plus loin). Il correspond à la *face de maturation* souvent décrite dans les ouvrages.

Au-delà de la face *trans* du dictyosome on peut rencontrer le **réseau trans-golgien** (aussi appelé **réticulum du trans-Golgi**) ou **TGN** *(Trans Golgi Network)*: il s'agit d'un réseau fait de saccules polymorphes et de vésicules. L'aspect de ce réseau est particulièrement variable et dépend de la destination des composés transportés.

Il existe donc une **polarisation** dans cet organite. On verra que cette polarisation correspond à un fonctionnement très sophistiqué de l'appareil de Golgi.

c. Les lysosomes

Les **lysosomes** (du grec *lusis*, dissolution, *soma*, le corps) sont des organites cellulaires, très hétérogènes sur le plan morphologique, de taille comprise entre 0,05 et 0,5 µm dans les cellules animales, qui contiennent les enzymes digestives capables de dégrader la plupart des macromolécules biologiques. Ce sont aussi les organites cellulaires où se fait cette digestion: on peut donc parler d'un véritable « estomac cellulaire ». On verra aussi que ce compartiment, à cause de son contenu enzymatique, peut être aussi considéré comme un réservoir d'armes chimiques dangereuses et à la limite devenir un « sac suicide ».

Dans les cellules végétales ce compartiment est le *compartiment vacuolaire*, c'est-à-dire à la fois les nombreuses petites vacuoles des cellules méristématiques et la vacuole unique des cellules différenciées. Dans ce dernier cas la vacuole est un compartiment terminal qui représente pour la cellule mature un « estomac » et un « grenier » cellulaires.

Les lysosomes sont des sacs contenant des *hydrolases acides*, c'est-à-dire des enzymes dont l'optimum d'activité est à un pH compris entre 4 et 5. C'est la valeur du pH maintenu à l'intérieur de ces organites *(fig. VII-4)*. À ce jour plus de 50 enzymes ont été identifiées dans les lysosomes. Ces enzymes sont hermétiquement enfermées dans une membrane. Ceci peut être démontré expérimentalement. Si on ajoute des substrats à une fraction lysosome intacte, les substrats ne sont pas hydrolysés; en revanche, si l'on ajoute des substrats à une fraction lysosome altérée (par des moyens mécaniques, par choc osmotique ou par action de détergents) les substrats sont hydrolysés.

L'*intégrité de la membrane des lysosomes* est donc tout à fait nécessaire. La membrane lysosomale présente plusieurs caractéristiques *(fig. VII-4)*:

– elle doit maintenir le système clos;

– elle doit permettre le passage des ions H^+ du cytosol vers l'intérieur du lysosome de façon à maintenir un pH acide (rappelons que le pH du cytosol est voisin de 7,2). La membrane comporte donc des pompes à pro-

Face *trans*
Citerne d'un saccule (lumière)
Vésicule de secrétion
Vésicule golgienne
Face *cis*
A

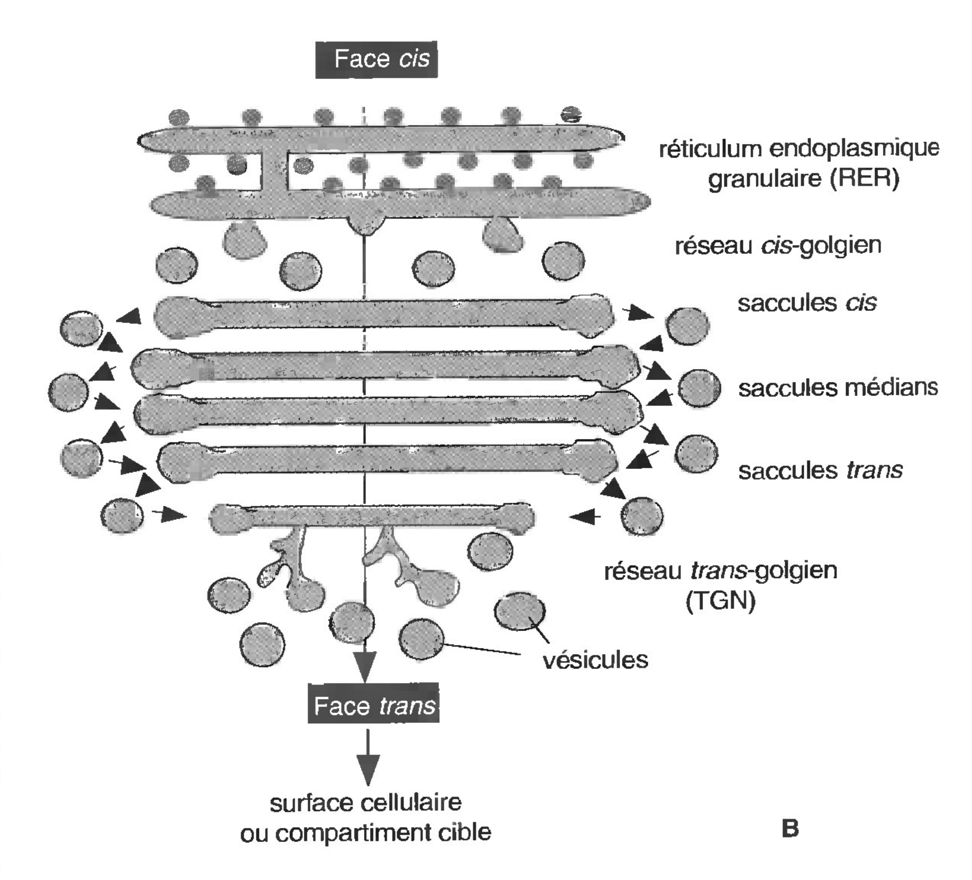


Fig. VII-3 : L'appareil de Golgi.
A) Réseau de Golgi formé de l'arrangement de 4 dictyosomes dans une cellule animale.
(Reproduction de la fig. 8-59A de B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS et J. WATSON. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York, 1989.)
B) Schéma d'un dictyosome. La flèche rouge indique la polarité du compartiment.

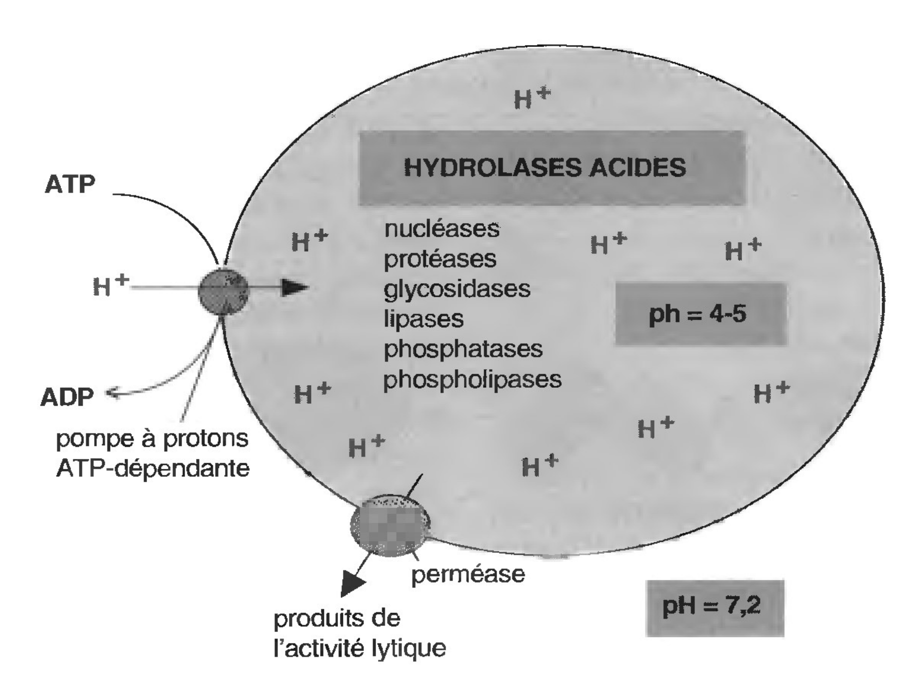


Fig. VII-4 : Les caractéristiques d'un lysosome.

tons ATP-dépendantes pour permettre ce passage ;

– elle doit permettre la sortie vers le cytosol des produits résultant de la digestion effectuée à l'intérieur du lysosome, ce qui implique la présence de perméases ;

– elle doit être elle-même protégée de sa propre digestion par les enzymes qu'elle retient ; sans que les mécanismes soient complètement élucidés, il semble que la membrane du lysosome soit protégée de l'intérieur par un revêtement glycoprotéique qui forme un véritable parapluie de protection.

Morphologiquement les lysosomes sont des *organites très hétérogènes*. Ils ont été décrits relativement tardivement, dans les années 1960, c'est-à-dire 10 ans après leur découverte par les voies biochimiques. Ils sont difficiles à observer sans marqueurs. Il est très difficile de décrire les lysosomes : leur aspect morphologique est dépendant du tissu envisagé, de leur origine, de leur mode de fonctionnement et de l'état de différenciation de la cellule. Très schématiquement on peut distinguer 3 catégories de lysosomes *(fig. VII-5)* :

– les **phagolysosomes** qui reçoivent, par l'intermédiaire de vésicules de phagocytose, les microorganismes ou les larges particules indésirables et destinés à être détruits. Ils sont particulièrement fréquents dans les cellules spécialisées dans la phagocytose, tels les macrophages et les globules blancs ;

–les **lysosomes** proprement dits qui reçoivent, venus des endosomes (sans doute *via* des vésicules recouvertes), les éléments extracellulaires internalisés par pinocytose (voir p. 180) ;

– les **autophagolysosomes**, ou vacuoles autophagiques, qui s'organisent à l'intérieur d'une cellule pour une autodégradation d'une partie de la cellule elle-même.

Bien entendu ces systèmes peuvent communiquer et cette classification reste relativement arbitraire. Par ailleurs tous les lysosomes reçoivent, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, les enzymes hydrolytiques ainsi que les protéines destinées à être intégrées aux membranes lysosomales (voir plus loin).

Il existe une autre terminologie, plus classique, qui distingue deux catégories de lysosomes selon les événements qui s'y déroulent :

– les **lysosomes primaires** : ce sont toutes les vésicules et vacuoles contenant des enzymes hydrolytiques actives mais non encore en présence de leur substrat. Elles correspondent aux vésicules dérivées du TGN qui apportent les enzymes aux lysosomes ;

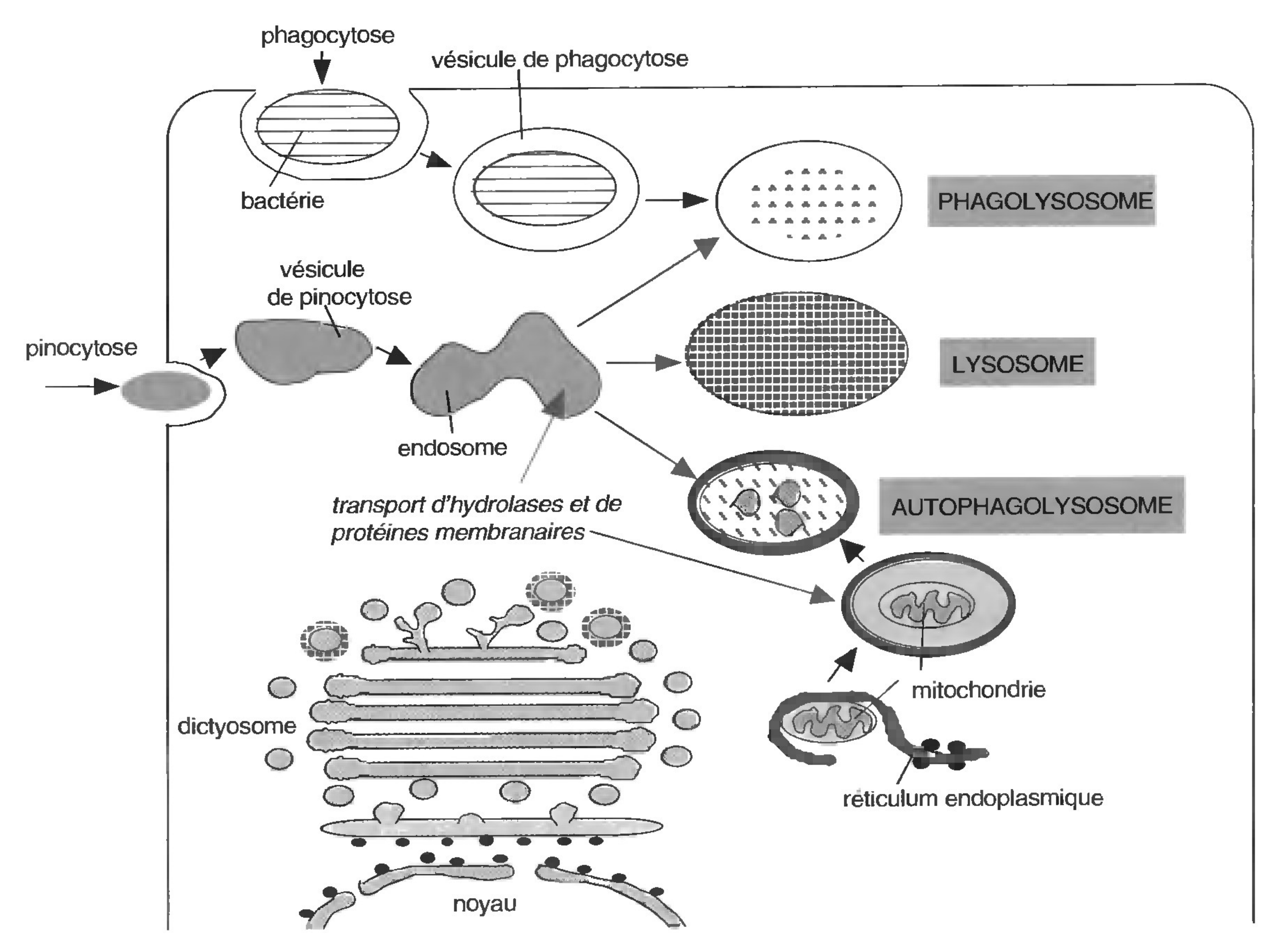


Fig. VII-5 : Les différentes catégories de lysosomes.

– les **lysosomes secondaires** : ce sont toutes les vacuoles où la digestion se fait après que la fusion avec les lysosomes primaires a eu lieu et que les enzymes ont été déversées.

Au total les compartiments endomembranaires constituent des systèmes extrêmement complexes, variables dans l'espace et dans le temps, auxquels il faut ajouter de multiples vésicules recouvertes ou non. On verra plus loin que, malgré une apparente fragmentation de ces systèmes, ils remplissent dans la cellule, de façon tout à fait coordonnée et hiérarchisée, de multiples fonctions.

1.2. MÉTHODES D'APPROCHE ET COMPOSITION CHIMIQUE

A. *Isolement, purification et identification de fractions*

Les méthodes de fractionnement cellulaire ont été détaillées dans d'autres chapitres (voir en particulier les chapitres concernant la membrane plasmique et la traduction). Rappelons que les membranes des compartiments intracellulaires se retrouvent dans le culot post-mitochondrial : elles constituent la *fraction microsomes* à partir de laquelle il est possible de séparer les **microsomes lisses**, c'est-à-dire les membranes du réticulum endoplasmique lisse (SER) et de l'appareil de Golgi, et les

microsomes rugueux, c'est-à-dire les membranes du RER (voir p. 228).

Pour ce qui est des lysosomes, il est difficile de donner une technique précise. La taille des lysosomes est en effet très variable et dépend du type cellulaire. En règle générale, les lysosomes peuvent être récupérés dans les premières étapes de la centrifugation différentielle, à des vitesses voisines de celles qui permettent de sédimenter les mitochondries. Les conditions de préparation sont très délicates : en particulier il est important de protéger la membrane des lysosomes des chocs osmotiques pour éviter la « fuite » des enzymes lysosomales.

Pour établir la composition biochimique des différents compartiments, le premier problème est un problème d'**identification** des compartiments dans les fractions obtenues. Pour cela il est nécessaire de disposer de marqueurs. Les marqueurs les plus utilisés sont les **marqueurs enzymatiques**, certaines enzymes étant spécifiques de tel ou tel compartiment *(fig. VII-6)*. Ce sont des enzymes qui sont enchâssées dans la bicouche lipidique. Il est très difficile de donner des indications sur la composition chimique des différents compartiments internes (membranes et contenus) : elle est en effet très variable selon les types cellulaires et même au sein d'un même compartiment. En revanche, les méthodes de la cytochimie ultrastructurale permettent maintenant une approche nouvelle riche en informations.

	Épaisseur des membranes	**« Marqueurs » de fractions**
Réticulum endoplasmique	5-6 nm	glucose-6-phosphatase cytochrome P-450 cytochrome b5 réductase
Appareil de Golgi	6-7,5 nm	nucléosides diphosphatases glycosyltransférases sulfotransférases
Lysosomes et vacuoles	7,5 nm	nucléases phosphatases phospholipases glycosidases protéases…

Fig. VII-6 : Quelques caractéristiques biochimiques et structurales des compartiments endomembranaires.

B. *Cytochimie ultrastructurale*

La cytochimie ultrastructurale permet de connaître la nature des composés liés aux membranes ou contenus dans les compartiments spécialisés. Plusieurs approches sont maintenant possibles.

a. *Recherche de composés chimiques : exemple des polysaccharides*

Parmi les composés détectables *in situ*, les polysaccharides ont fait l'objet de nombreuses visualisations. En particulier le test PATAg permet de localiser les polysaccharides à l'échelle ultrastructurale. Le principe a été détaillé dans le chapitre concernant les glucides (voir chap. V, 1re partie).

L'utilisation du test PATAg est particulièrement intéressante pour détecter en place les éléments de l'appareil de Golgi spécialisés dans la synthèse et la transformation des polysaccharides. Selon les types cellulaires, on peut ainsi observer un marquage plus ou moins important des extrémités renflées des saccules golgiens et surtout des vésicules dérivées sur la face *trans*, indiquant une accumulation de polysaccharides ou de glycoprotéines possédant suffisamment de motifs glucidiques pour être détectables. La *figure VII-7* montre un exemple de détection de polysaccharides dans un dictyosome et ses vésicules dérivées : il s'agit d'une cellule végétale en cours de synthèse active de polysaccharides de paroi. Une réactivité est détectable dans les vésicules de la face *trans* de l'appareil de Golgi ainsi que dans des vésicules de sécrétion qui dérivent de celui-ci. La réactivité est toutefois faible comparée à celle des grains d'amidon où les polysaccharides sont massivement réactifs.

b. *Recherche d'activités enzymatiques*

La recherche d'activités enzymatiques est la méthode de choix pour repérer et identifier les compartiments endomembranaires qui transportent de nombreuses enzymes. C'est particulièrement le cas des lysosomes.

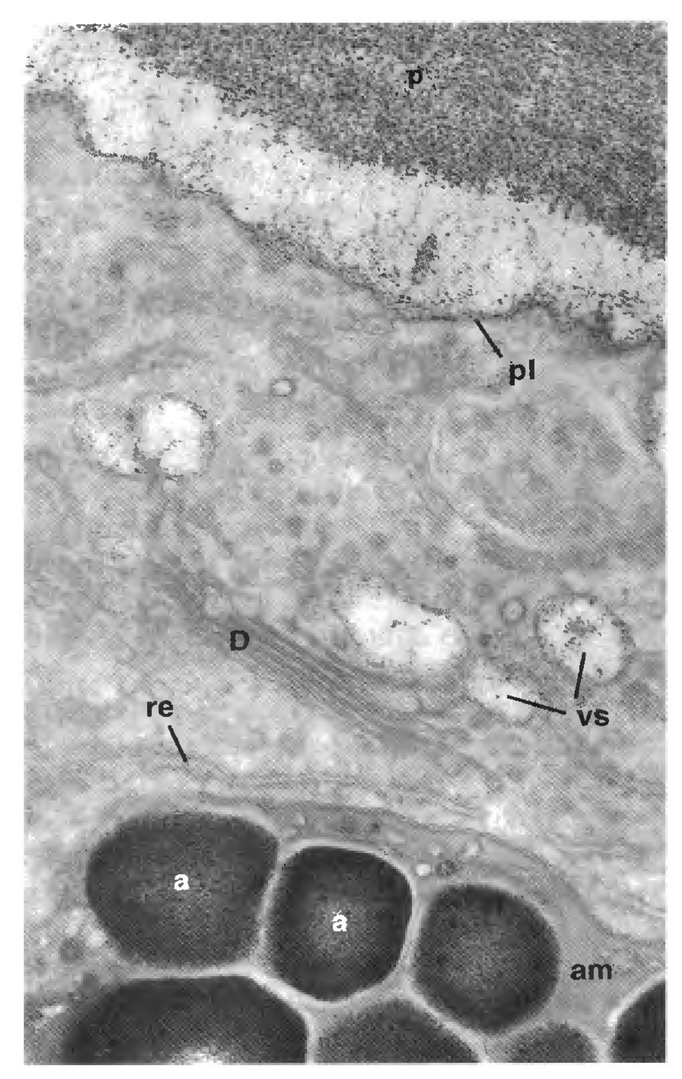


Fig. VII-7 : Dictyosome contrasté par le test PATAg pour visualiser les polysaccharides.
On observe une réactivité dans les vésicules de sécrétion (vs) dérivées de la face *trans* du dictyosome (D). La réactivité au test est plus intense dans la paroi (p) et dans les grains d'amidon (a) des amyloplastes (am), où les polysaccharides sont massivement présents ; pl, membrane plasmique ou plasmalemme ; re, réticulum endoplasmique. G. x 30 000.
(Cliché B. VIAN.)

La méthode permettant cette détection est la suivante : une coupe dans un échantillon biologique fixé chimiquement (la fixation doit être suffisamment contrôlée pour que les protéines enzymatiques conservent une certaine activité) est mise en présence d'un substrat susceptible d'être dégradé. Si l'hydrolyse enzymatique a lieu, un des produits est couplé à un réactif qui précipite et change de couleur (pour être vu en microscopie photonique) ou devient opaque aux électrons (pour être vu en microscopie électronique). Par exemple une méthode classique de recherche de phosphatases en microscopie électronique utilise une visualisation à l'aide de sels de plomb *(fig. VII-8). Aux sites où la phosphatase est présente et active, on aura donc un précipité opaque aux électrons.*

Le principe est ici très général. De nombreuses phosphatases existent qui hydrolysent spécifiquement différents substrats et à des pH très définis (phosphatases dites acides, neutres ou alcalines). Leur détection spécifique sera donc contrôlée par le *choix du substrat* et le *contrôle du pH* du milieu d'incubation. Ce type de méthode a conduit à localiser de nombreuses enzymes – ou au moins des sites où ces enzymes sont présentes sous une forme active – dans les différents compartiments endomembranaires.

En ce qui concerne les dictyosomes cette méthode permet de préciser la distribution des systèmes enzymatiques dans les *différents sous-compartiments golgiens, cis,* médian et *trans (fig. VII-9).* On voit que l'activité des enzymes associées aux membranes n'est souvent décelable que dans certains sous-compartiments qui ne seront pas les mêmes selon les enzymes recherchées. Il existe une **polarisation biochimique** des saccules golgiens. Grâce à ces détections il devient ainsi possible d'établir une « carte » des dictyosomes.

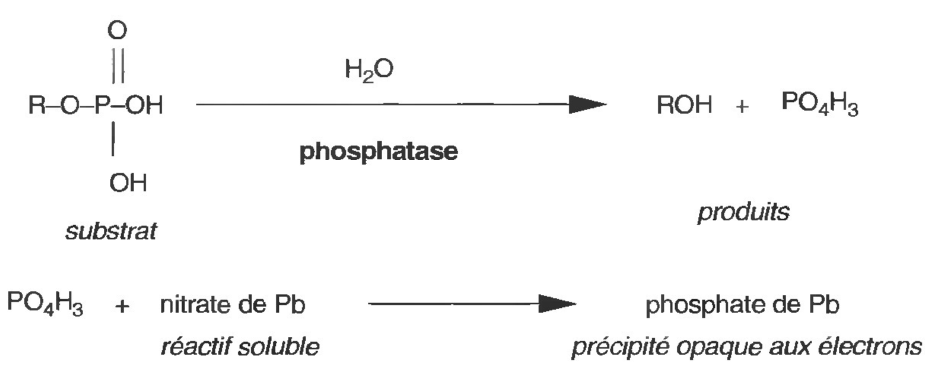


Fig. VII-8 : Principe de la réaction permettant la détection d'une phosphatase.

c. *Détection immunocytochimique des composants membranaires ou des contenus intracisternaux*

C'est actuellement la méthode la plus utilisée dans la mesure où elle atteint un degré de spécificité difficile à obtenir avec les autres méthodes. Le principe de l'immunocytochimie a déjà été développé dans d'autres chapitres (voir en particulier le chapitre concernant les protéines dans la 1re partie, p. 90). On prépare des anticorps aussi purs que possibles dirigés contre tel ou tel composant (antigène) présent dans un organite. Les anticorps sont ensuite utilisés comme **sondes** pour rechercher l'antigène *in situ*, aussi bien en microscopie optique (grâce à des marqueurs fluorescents) qu'en microscopie électronique (grâce à des marqueurs métalliques visibles, par exemple l'or colloïdal).

Deux objectifs peuvent être poursuivis :

– soit la recherche des *macromolécules qui font partie intégrante des membranes des compartiments* ;

– soit l'identification des *macromolécules qui sont contenues dans les compartiments et éventuellement destinées à être exportées.*

C. Autoradiographie

La méthode d'autoradiographie permet de repérer les lieux de synthèse et de suivre éventuellement le cheminement des molécules dans la cellule après leur synthèse. Les résultats obtenus avec ce type de méthode seront analysés en détail dans l'expérience de JAMIESON et PALADE (voir p. 300).

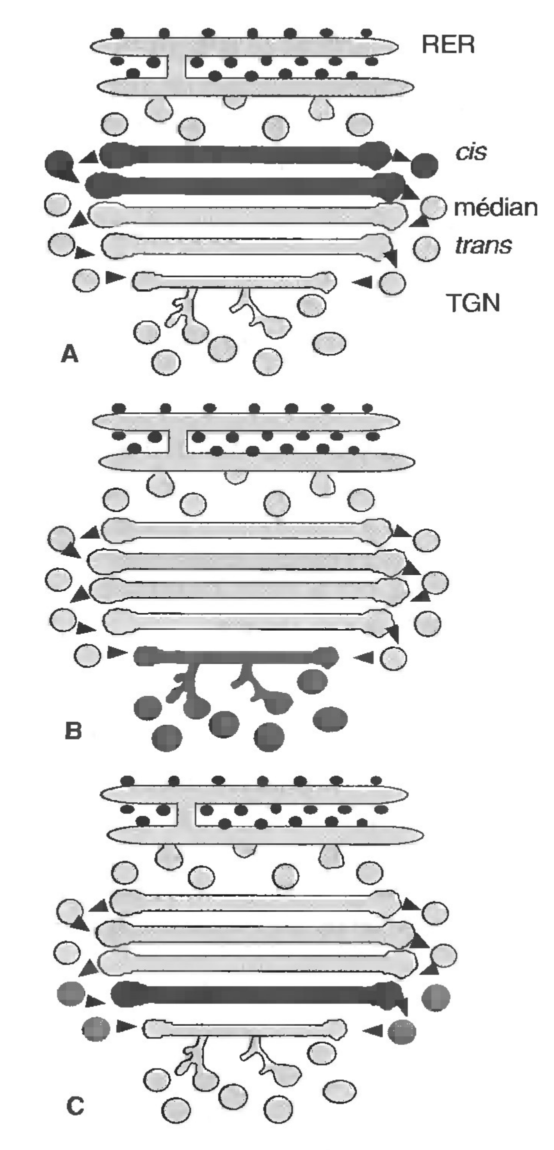


Fig. VII-9 : Polarisation biochimique des dictyosomes révélée par la détection à l'échelle ultrastructurale de quelques activités enzymatiques.
A) Détection de la NAD-phosphatase.
B) Détection d'une phosphatase acide.
C) Détection de la nucléoside-diphosphatase.

2. RÔLES PHYSIOLOGIQUES

Les fonctions des compartiments endomembranaires sont très variées. Elles sont essentielles dans la mesure où elles participent à la fois :

– à l'édification des constituants cellulaires (synthèse de lipides et de protéines des membranes, synthèse des protéines enzymatiques destinées à être intégrées aux membranes) ;

– à la machinerie du métabolisme, par tous les mécanismes de sécrétion, de digestion, de détoxication...

Même si globalement le fonctionnement des compartiments endomembranaires est similaire dans les cellules animales et les cellules végétales, il existe des différences notables, en particulier au niveau de l'appareil de Golgi et des lysosomes. Dans un souci de simplification, les données présentées dans ce chapitre concernent principalement les cellules animales relativement mieux connues dans la mesure où elles ont été plus étudiées. Quelques aspects caractéristiques des cellules végétales seront toutefois précisés ponctuellement.

2.1. BIOSYNTHÈSE DES LIPIDES ET DES GLYCOLIPIDES MEMBRANAIRES

Cette synthèse a lieu essentiellement dans le réticulum endoplasmique. Les membranes du réticulum possèdent en effet tout l'équipement enzymatique nécessaire pour faire de nombreuses réactions du métabolisme des lipides. ***Le réticulum endoplasmique est dans la cellule un véritable « pourvoyeur » de membranes.***

- **Biosynthèse des phospholipides**

Elle est importante puisque cette synthèse va permettre d'assurer le renouvellement des membranes. La synthèse se fait par élongation et désaturation à partir d'acides gras simples présents dans le cytosol. Les enzymes impliquées sont localisées sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique.

La question se pose de savoir comment les molécules synthétisées sur une face à partir de métabolites présents uniquement dans le cytosol (c'est-à-dire sur la face cytosolique de la bicouche) sont réparties dans toute la membrane alors que le « flip-flop » des phospholipides (mouvement de bascule spontané des lipides d'une couche à l'autre dans la membrane, voir le chapitre concernant la membrane plasmique) ne semble pas exister. Il est admis que, après la synthèse d'une masse de lipides sur la moitié cytosolique, des protéines spécifiques, les **flippases**, sont capables de transférer sélectivement des lipides sur l'autre face de la membrane *(fig. VII-10)*.

Les phospholipides nouvellement synthétisés sont donc incorporés à la membrane dont ils assurent ainsi le renouvellement. Des morceaux de membrane neuve peuvent parfois être transmis en bloc et permettre l'extension de secteurs membranaires.

Le greffage des sucres, tels le galactose ou l'acide sialique, sur les glycolipides, a lieu dans l'appareil de Golgi.

- **Biosynthèse des triglycérides**

Cette synthèse est effectuée par le réticulum endoplasmique lisse. Dans les adipocytes par exemple, c'est-à-dire des cellules situées sous la peau et dont la fonction est de stocker des lipides, le SER est particulièrement abondant.

- **Biosynthèse du cholestérol**

Dans les cellules animales, la synthèse du cholestérol s'effectue surtout dans les hépatocytes où un important SER est développé. C'est aussi le réticulum endoplasmique qui est engagé dans la synthèse des hormones

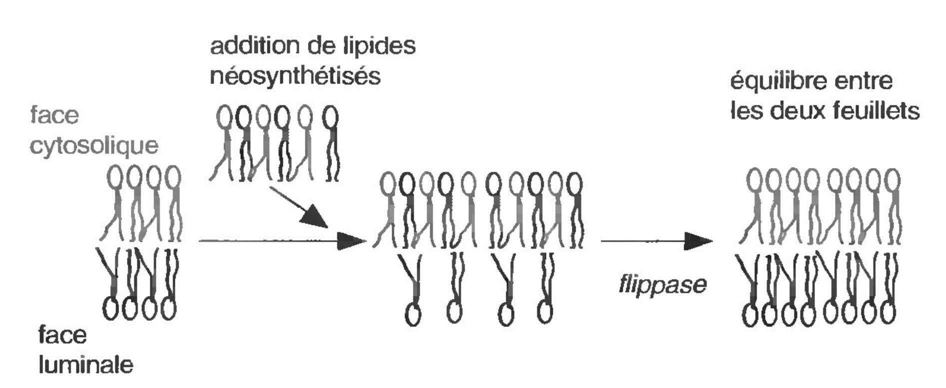


Fig. VII-10 : Schéma montrant le rôle d'une protéine de transfert (flippase) dans le passage de phospholipides de la face cytosolique de la membrane vers la face luminale dans le réticulum endoplasmique.

stéroïdes : la testostérone dans les testicules, la progestérone dans l'ovaire, les cortisones dans les glandes surrénales. Toute la partie lipidique de ces hormones est synthétisée dans le SER. On verra plus loin que lorsqu'une partie glucidique est ajoutée elle l'est généralement dans l'appareil de Golgi.

2.2. BIOSYNTHÈSE, TRANSFERT ET CONCENTRATION DE (GLYCO)PROTÉINES

A. *Ségrégation des protéines*

Les mécanismes de la synthèse des protéines sur les polysomes ont été abordés dans le détail dans le chapitre concernant la traduction. On peut distinguer deux types de protéines : a) les protéines synthétisées sur les polysomes libres qui constituent les *protéines cytosoliques* ; b) les protéines synthétisées sur les polysomes liés au réticulum endoplasmique qui constituent les *protéines de sécrétion* (ou d'exportation), les *protéines intrinsèques de membranes* (réticulum endoplasmique, dictyosomes et surtout membrane plasmique qui est une membrane terminale), les protéines destinées au compartiment interne représenté par les *lysosomes* dans les cellules animales ou la *vacuole* dans les cellules végétales (voir p. 244).

Plusieurs questions se posent : comment se fait le choix entre protéines du cytosol, protéines exportées, protéines de stockage ? Comment les polypeptides synthétisés à l'extérieur du RER peuvent-ils gagner la lumière de ce compartiment ? Comment les ribosomes sont-ils dirigés vers le réticulum endoplasmique dans le cas des protéines non cytosoliques ? Où et comment les protéines vont-elles cheminer ? Nous allons tenter de répondre à certaines de ces questions.

- **Les protéines de sécrétion nouvellement synthétisées sont contenues dans les citernes du RER**

Une expérience simple permet de montrer où sont localisées les protéines de sécrétion juste après leur synthèse *(fig. VII-11)*. On prépare des *microsomes rugueux* (fragmentation du RER) à partir de cellules ayant subi un pulse de leucine tritiée. Cette fraction microsomes est radioactive ce qui signifie que des polypeptides se sont formés pendant le pulse et sont associés à ces microsomes. On ajoute à la fraction :

– de la protéinase. Après un temps d'incubation on observe que les polypeptides néosynthétisés sont intacts. Ils sont protégés par la membrane des microsomes.

– de la protéinase après traitement des microsomes par un détergent qui solubilise partiellement la membrane. On observe alors que les polypeptides néosynthétisés sont dégradés. Il apparaît donc que *les protéines nouvellement synthétisées sont contenues à l'intérieur des saccules du réticulum endoplasmique granulaire.*

- **La traversée de la membrane du RER est permise par une séquence signal**

En fait c'est la présence d'une *séquence signal* dans le polypeptide naissant (donc de codons correspondants dans l'ARNm) qui détermine la synthèse sur le RER des protéines

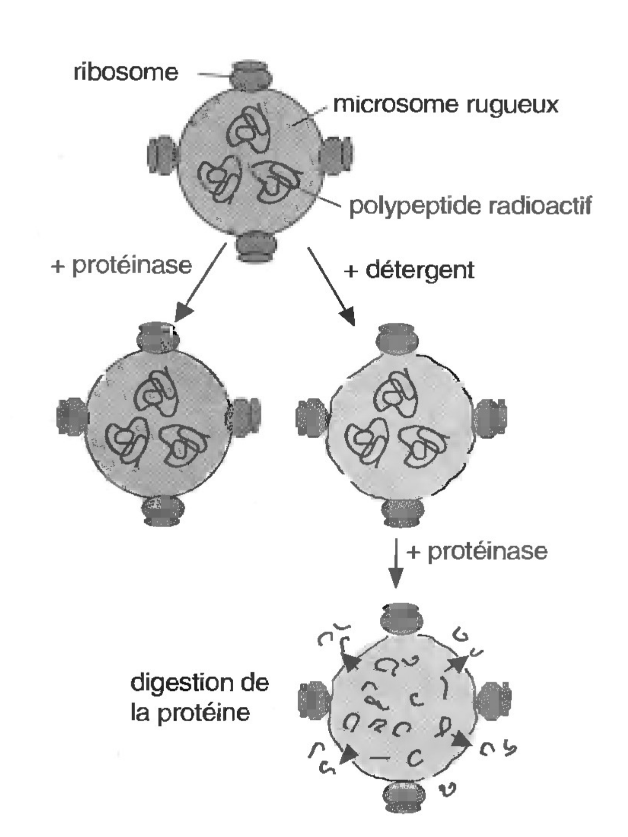


Fig. VII-11 : Expérience montrant que les protéines sont contenues dans la lumière du RER.

destinées à être incorporées dans les cavités du réticulum endoplasmique. Le schéma de la *figure VII-12* résume les mécanismes (encore hypothétiques pour certaines étapes) de la synthèse d'une protéine exportable.

Les ribosomes, libres dans le cytosol, se fixent sur l'ARNm au niveau d'un codon AUG (codon de départ). L'extrémité amino-terminale du polypeptide est d'abord une séquence constituée par 16 à 30 acides: c'est la ***séquence signal*** (parfois appelée *peptide signal* ou *séquence-guide*). Cette séquence comprend généralement quelques acides aminés chargés positivement à l'extrémité N-terminale puis une douzaine d'acides aminés hydrophobes. La séquence signal est guidée au réticulum endoplasmique par l'intervention de deux systèmes:

– une particule qui reconnaît le peptide signal, appelée ***particule SRP*** *(signal recognition particle)*. C'est une particule cytosolique faite de 6 polypeptides différents et d'un ARN de 300 nucléotides. La particule SRP s'attache à la fois au ribosome et au peptide signal; elle fait la navette entre le réticulum endoplasmique et le cytosol;

– un ***récepteur de la particule SRP*** qui est présent sur la face cytosolique du RER et qui permet l'arrimage du ribosome sur le RER.

Le rôle exact de la particule SRP et de son récepteur n'est pas encore parfaitement compris. Des expériences récentes ont montré que la SRP bloque la chaîne naissante à 70 acides aminés, soit la longueur du peptide-signal plus 30 acides aminés encore enfouis dans la gorge du ribosome. Le récepteur de la SRP lèverait ce blocage et permettrait la liaison du ribosome à la membrane du RER.

Sans que les mécanismes en soient très clairs, il semble que, lors de la fixation du complexe ribosome + particule SRP sur le récepteur de la SRP, la séquence-guide soit reconnue par un *récepteur de la séquence signal*, protéine intrinsèque de la membrane du RER. Ceci conduit à l'organisation d'un tunnel transmembranaire, le canal de translocation, grâce à des *protéines réceptrices des ribosomes*, permettant ainsi le passage du polypeptide en cours de synthèse dans la citerne de RER. Le polypeptide est alors synthétisé dans son entier par lecture du message de l'ARNm.

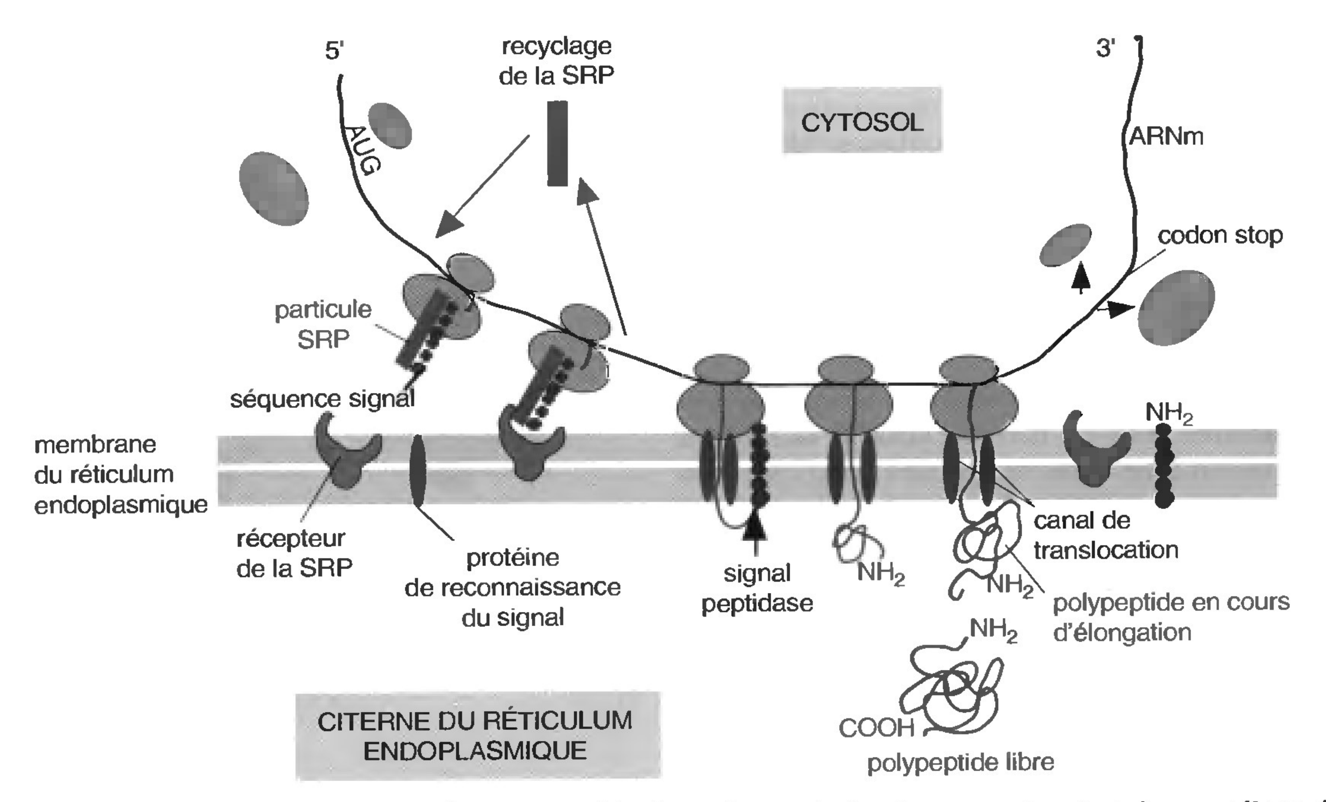


Fig. VII-12: Biosynthèse d'une protéine exportable. Importance de la séquence signal et des protéines de reconnaissance.

Dans la cavité du RER la séquence signal est très rapidement reconnue et excisée par l'intervention d'une ***signal-peptidase*** (ou clipase) présente sur la face luminale du RER. À la fin de l'élongation, c'est-à-dire lors de la lecture du codon stop, le polypeptide (donc dépourvu de son peptide signal) peut être libéré dans la cavité du RER.

La séquence signal est donc une séquence transitoire. C'est la raison pour laquelle elle n'a été découverte qu'assez tardivement, dans les années 1970, par BLOBEL et son équipe. C'est cette séquence en bases qui détermine si le polysome sera libre ou associé au RER.

• Les protéines intrinsèques sont orientées dans la membrane par des séquences topogéniques

Qu'en est-il des protéines transmembranaires, c'est-à-dire des protéines qui restent intégrées aux membranes? Certaines sont au départ synthétisées comme des protéines exportables, mais un signal constitué par exemple par une longue séquence hydrophobe interrompt le transfert. La protéine produite possède son extrémité N-terminale dans la cavité du RER et la C-terminale dans le cytosol. Un exemple de protéine élaborée ainsi est la glycophorine (voir p. 144). La question se pose, sous un jour différent, pour les protéines ayant une orientation inverse ou traversant plusieurs fois la membrane.

Là encore tous les mécanismes ne sont pas parfaitement élucidés. Il semble toutefois qu'il existe dans le polypeptide des « ***séquences topogéniques*** » qui permettent l'ancrage de régions polypeptidiques dans la membrane et qui sont de deux types: des séquences *signal de départ de transfert* et des séquences *signal d'arrêt de transfert*. Selon le nombre et la place de ces séquences topogéniques dans le polypeptide on aboutira à des intégrations de protéines différentes dans la membrane *(fig. VII-13)*.

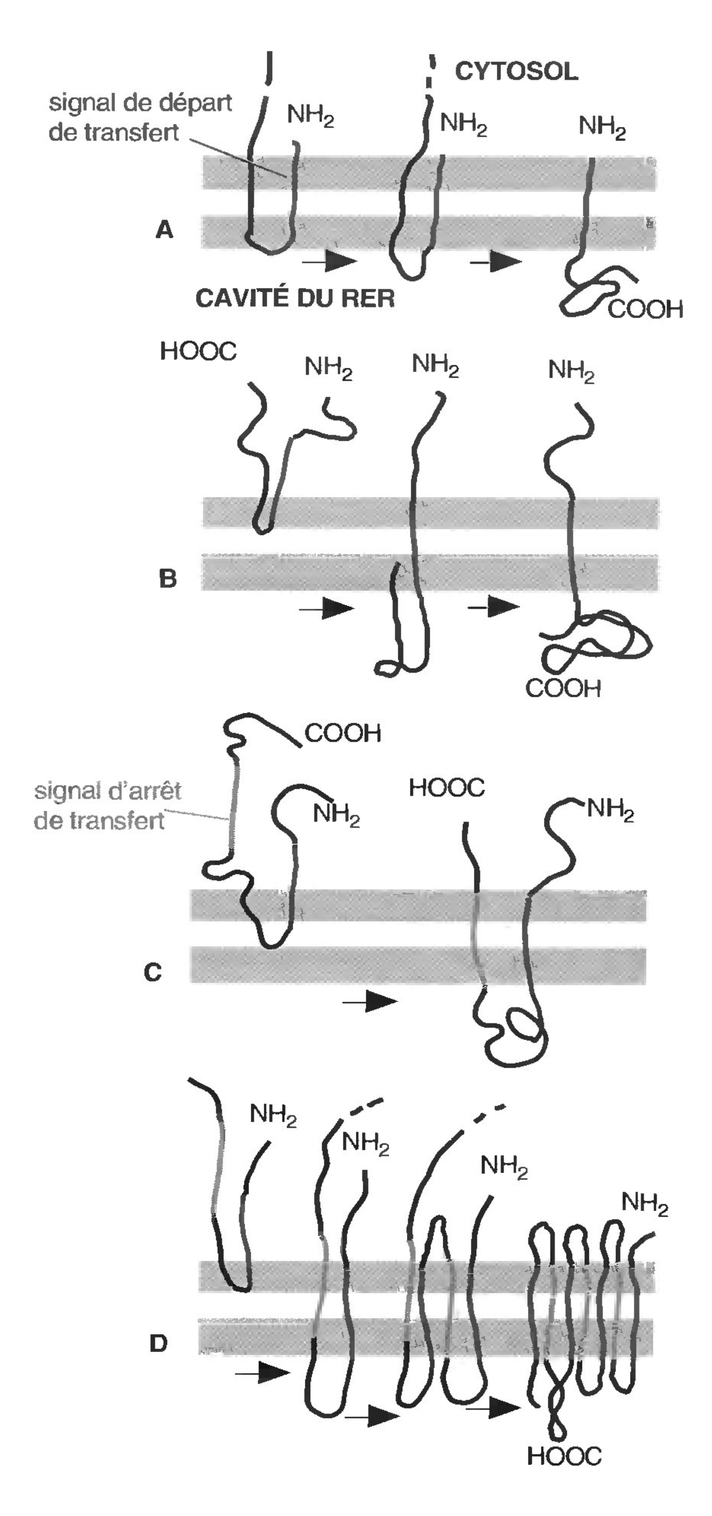


Fig. VII-13: Séquences topogéniques et protéines transmembranaires. Schémas hypothétiques.
A) Signal départ de transfert au début du polypeptide, à l'extrémité NH_2. La protéine possède un seul domaine tourné vers la cavité du RER.
B) Signal de départ de transfert au milieu du polypeptide. La protéine possède deux domaines: l'un cytoplasmique, l'autre luminal.
C et D) Alternance de signal de départ de transfert et d'arrêt de transfert conduisant à des protéines transmembranaires traversant la membrane un plus ou moins grand nombre de fois (sous forme d'hélice α).
(Redessiné à partir de la figure 8-48 de B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS et J. WATSON. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York, 1989.)

B. *Transport des protéines*

Deux types d'expérience ont permis de montrer les voies que pouvaient suivre les protéines dans la cellule après leur synthèse.

a. *Mise en évidence par autoradiographie*

C'est l'expérience effectuée par JAMIESON et PALADE en 1967 et dont le protocole est résumé sur la *figure VII-14*.

Des tranches de pancréas de cobaye sont mises en culture en boîte de Pétri. De la leucine ^3H est ajoutée pendant un temps bref (3 minutes) à la culture : c'est un ***pulse***. Quelques échantillons sont lavés, fixés chimiquement et préparés pour une observation en microscopie électronique. Un marquage est observé à la base des cellules, dans la région où des nappes de RER sont très abondantes *(fig. VI-15, A)*. La leucine a été incorporée pendant le pulse dans le réticulum endoplasmique granulaire : la ***synthèse des protéines a eu lieu dans les polyribosomes liés au réticulum endoplasmique.***

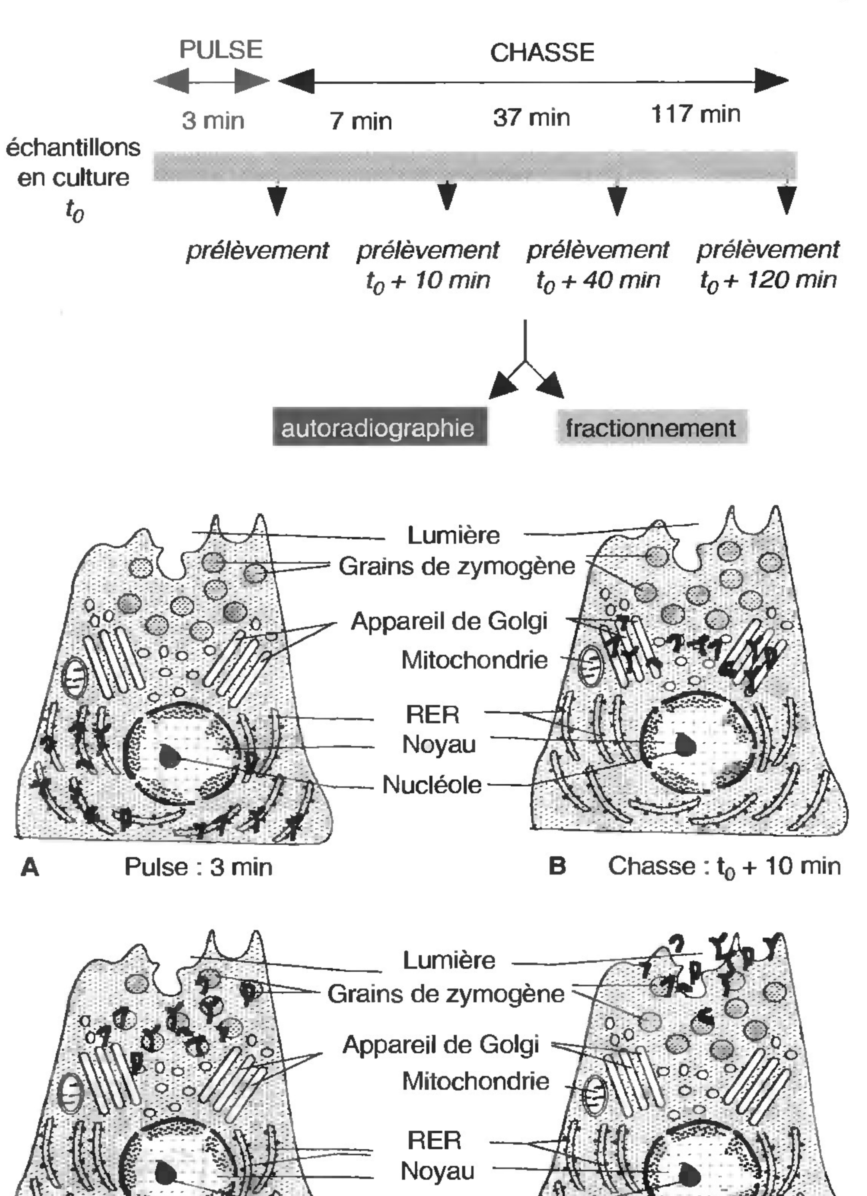


Fig.VII-14 : Protocole de l'expérience de JAMIESON et PALADE (1967).

Fig. VII-15 : Expérience de Jamieson et Palade (1967).
A) Pulse dans la leucine tritiée pendant 3 minutes.
B, C et D) Chasse (respectivement 7, 37 et 117 minutes).

Après le pulse, d'autres échantillons sont transférés dans un milieu froid (c'est-à-dire un milieu où la leucine est non radioactive) et maintenus en incubation pendant des périodes de *chasse* de 7, 37 et 117 minutes. À la fin de chaque période de chasse des échantillons sont lavés, fixés chimiquement et préparés pour la microscopie électronique. Après une chasse de 7 minutes, donc 10 minutes après le début de l'expérience, le marquage est localisé dans la partie médiane de la cellule, riche en dictyosomes *(fig. VII-15, B)*. Après 40 minutes, le marquage est localisé sur les vésicules de sécrétion immatures, voisines de l'appareil de Golgi, et appelées grains de zymogène dans ce tissu *(fig. VII-15, C)*. Deux heures après le début de l'expérience, le marquage se retrouve dans les grains de zymogène matures, dans ceux en cours d'exocytose et dans la lumière de l'acinus pancréatique *(fig. VII-15, D)*. Cette expérience de chasse indique que les protéines radioactives ont migré après leur synthèse : elles passent dans l'appareil de Golgi où elles semblent se concentrer (les grains d'argent paraissent nombreux sur une faible surface) ; puis elles sont enfermées dans un grain de sécrétion et libérées à l'extérieur de la cellule deux heures après leur synthèse. ***Il y a donc eu transport, concentration et export des protéines, apparemment*** **via** ***les compartiments endomembranaires.***

b. Mise en évidence par les techniques biochimiques

Cette expérience d'autoradiographie devait être confirmée par des analyses biochimiques effectuées en parallèle sur le même type d'échantillons. Le protocole expérimental de mise en culture est le même *(fig. VI-14)*. Après le pulse de 3 minutes avec la leucine ^3H, certains échantillons subissent un fractionnement cellulaire de façon à obtenir 4 fractions : une *fraction microsomes rugueux* (RER), une *fraction microsomes lisses* (principalement l'appareil de Golgi et ses dérivés), une *fraction grains de sécrétion* (grains de zymogène) et une *fraction surnageant* (cytosol dilué). La radioactivité de ces fractions est mesurée à la fin du *pulse* au moyen d'un compteur à scintillation.

Comme dans l'expérience précédente les échantillons subissent des temps de *chasse* différents (7, 37, et 117 minutes). Ils sont fractionnés et leur radioactivité est mesurée au compteur à scintillation.

Le résultat de ces mesures, exprimé en coups par minutes en fonction du temps, apporte deux sortes d'information *(fig. VII-16)*:

– la radioactivité du surnageant est très faible et surtout ne varie pas pendant toute la durée de l'expérience. Ceci confirme l'hypothèse que les protéines ne passent à aucun moment dans le cytosol. Les protéines exportées transitent donc par les compartiments endomembranaires ;

– on observe un décalage des courbes indiquant que, après leur synthèse dans le RER, les protéines passent dans l'appareil de Golgi, sont stockées environ une heure dans les grains de sécrétion avant d'être libérées dans la lumière (la radioactivité est alors perdue en raison des lavages).

Il y a donc un transfert RER → appareil de Golgi → grains de zymogène → lumière de l'acinus.

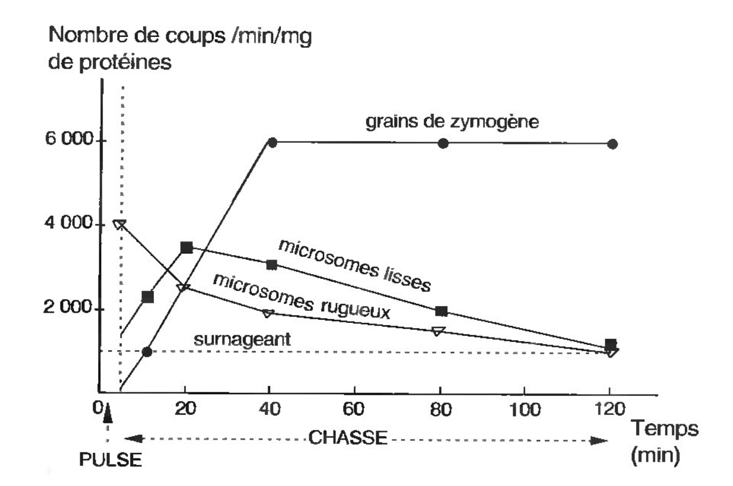


Fig. VII-16 : Radioactivité spécifique des fractions après un pulse en présence de leucine tritiée et une chasse.

C. Maturation des protéines

Le long de ce cheminement les protéines subissent de nombreuses transformations. Elles sont de plusieurs sortes : la formation de liaisons disulfure (les ponts S–S établis entre les résidus cystéine), le pliage des protéines leur permettant d'acquérir une conformation tridimensionnelle, des clivages protéolytiques

aboutissant à l'excision de certaines séquences polypeptidiques, l'addition d'oligosaccharides et la modification éventuelle de ces séquences oligosaccharidiques (glycosylation et élagage). Toutes ces transformations permettent à la protéine d'acquérir son état définitif: c'est la **maturation des protéines.**

- **Des protéines chaperons interviennent dans le repliement des protéines**

En ce qui concerne le repliement des protéines, nous avons vu qu'il est déterminé par la séquence primaire du polypeptide mais sous le contrôle de protéines chaperons (voir p. 56). Le concept de protéines chaperons est un concept nouveau important dans la mesure où il remet en cause ce dogme bien établi de la biologie cellulaire selon lequel la structure tridimensionnelle d'une protéine active dépend de sa séquence et correspond à l'état thermodynamique le plus stable pour la protéine dans son environnement. En se fixant sur le polypeptide déplié au fur et à mesure de sa synthèse, aussi bien au niveau des polysomes libres dans le cytosol que des polysomes liés aux membranes du RER *(fig. VII-17)*, les protéines chaperons recouvrent apparemment les acides aminés hydrophobes, les empêchant d'interagir avec d'autres acides aminés hydrophobes voisins dans la même chaîne ou dans une protéine voisine. Cette protection ***évite probablement un repliement prématuré de la protéine*, minimise les risques de repliement incorrect et empêche l'agrégation entre polypeptides voisins***.

Dans ce rôle il semble que plusieurs protéines chaperons agissent en coopération (HSP 70, HSP 40, GroEL...). La liste n'est pas limitative. Le « chaperonnage » est actuellement un domaine de biologie cellulaire dont l'étude est en plein essor.

* Avant que la totalité de la macromolécule soit élaborée; en effet, un repliement prématuré interdirait des interactions entre acides aminés éloignés.

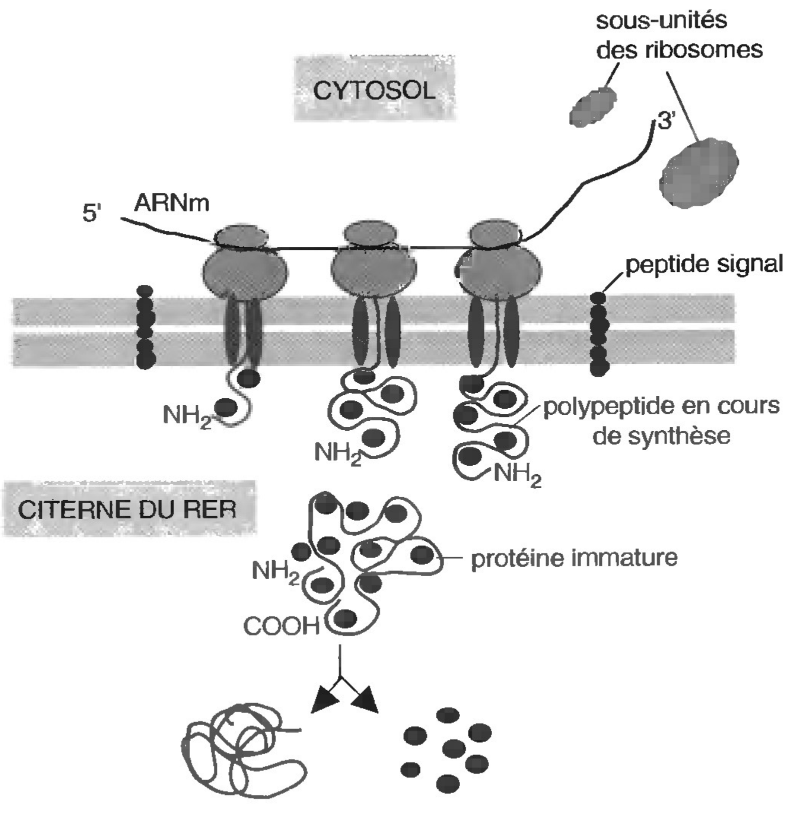


Fig. VII-17: Rôle possible des protéines chaperons dans le contrôle du repliement des polypeptides en cours de synthèse.

- **Clivages protéolytiques**

La maturation de l'insuline peut être prise comme exemple d'une transformation impliquant un clivage protéolytique important *(fig. VII-18)*. L'insuline est une protéine hormonale circulant dans le sang et réglant l'entrée de glucose dans les cellules. Elle est synthétisée par les cellules β du pancréas. C'est une protéine de sécrétion qui comporte donc une séquence signal permettant son entrée dans la lumière du réticulum endoplasmique.

L'insuline mature est un polypeptide comprenant deux chaînes (la chaîne A et la chaîne B) réunies par des ponts disulfure. En fait, l'insuline dérive d'un précurseur, la *pro-insuline*, qui comprend une troisième chaîne, le peptide C *(fig. VII-18, A)*.

Une expérience d'immunocytochimie a permis de repérer dans les cellules β la localisation de la pro-insuline et de l'insuline. Des anticorps sont préparés contre les deux molécules : on obtient ainsi des *anticorps anti-pro-insuline* et des *anticorps anti-insuline*. Les anticorps sont utilisés comme *sondes spécifiques* pour rechercher à l'échelle ultrastructurale la localisation de l'antigène correspondant. Avec les anticorps anti-pro-insuline on observe un marquage dans l'extrémité des saccules de l'appareil de Golgi et les vésicules qui en dérivent ainsi que dans des vésicules recouvertes de clathrine (vésicules mantelées) voisines de la face

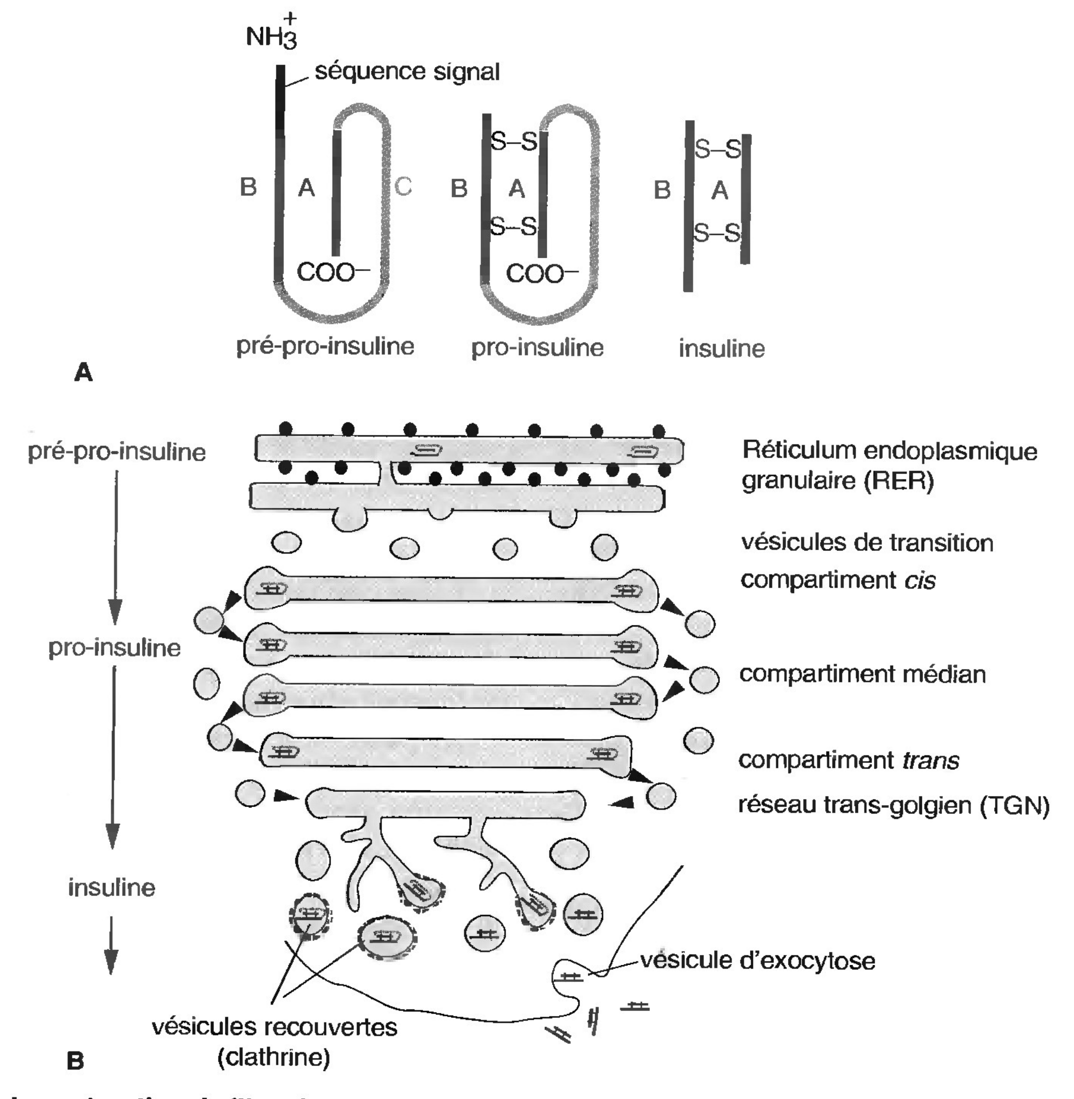


Fig. VII-18 : La maturation de l'insuline.
A) Structure schématique de la pré-pro-insuline (avec le peptide signal), de la pro-insuline et de l'insuline.
B) Les principales étapes de la biosynthèse de l'insuline.

trans du dictyosome. Avec les anticorps anti-insuline on observe un marquage sur les vésicules de sécrétion non mantelées et dans des vésicules en cours d'exocytose. De tels résultats indiquent que ***le clivage protéolytique a eu lieu au niveau des vésicules recouvertes***.

On peut résumer les principales étapes de la maturation de l'insuline *(fig. VII-18, B)*. La synthèse a lieu sur les polysomes liés au RER où grâce à une séquence signal (le *segment pré*) le polypeptide – appelé *pré-pro-insuline*– est injecté dans la citerne du RER. Le peptide signal est rapidement éliminé, des liaisons S–S se forment conduisant à la formation de la *pro-insuline* (la pro-insuline est peut-être fixée sur des récepteurs de la face luminale du RER ; ce point est actuellement encore controversé). Par des vésicules de transition la pro-insuline est amenée sur la face *cis* d'un dictyosome et transite dans les compartiments médians par des sauts de vésicules. Sur la face *trans* du dictyosome la pro-insuline est concentrée dans des vésicules mantelées, couvertes de clathrine, qui se détachent et migrent vers la surface en perdant rapidement leur manteau. C'est au cours de ce déplacement que, dans les vésicules, un clivage protéolytique de la pro-insuline a lieu : un polypeptide (le peptide C) est éliminé et la molécule qui sera exportée par exocytose est donc l'***insuline mature***.

Ce mécanisme de clivage protéolytique est fréquent. Beaucoup de protéines de sécrétion et de protéines membranaires sont en effet synthétisées sous une forme trop longue et inactive et doivent être amputées d'un ou de plusieurs secteurs pour devenir matures et actives : c'est le cas de l'albumine, une protéine du sérum, du glucagon, une protéine hormonale, de la protéine HA, une protéine membranaire.

- **Glycosylation et élagage**

Beaucoup de protéines sécrétées vont être *glycosylées* : ce sont en fait des *glycoprotéines*. Une expérience classique d'autoradiographie révèle où a lieu la glycosylation *(fig. VII-19)*. Elle a été réalisée sur des cellules à mucus qui tapissent la lumière de l'intestin de mammifères, cellules dont la plus grande partie du volume est occupée par des vésicules de sécrétion riches en mucus (glycoprotéines dont la partie glucidique est prépondérante).

Des cellules sécrétrices de l'intestin de rat (cellules à mucus) sont incubées en milieu de culture. Sur un lot de cellules on effectue un *pulse* de 3 minutes avec du mannose tritié (^{3}H mannose). Sur un autre lot on effectue un *pulse* de 3 minutes avec du fucose ^{3}H. Les tissus sont lavés, fixés chimiquement et préparés pour une autoradiographie en microscopie électronique. Le résultat des deux marquages indique que ***le mannose est incorporé aux protéines dès le réticulum endoplasmique** (fig. VII-19, A) **alors que le fucose est incorporé plus tardivement dans l'appareil de Golgi*** *(fig. VII-19, B)*.

La glycosylation apparaît donc **séquentielle**. Elle commence dans le RER. Chez les Eucaryotes les glucides sont fixés à 4 résidus d'acides aminés différents. On distingue : a) les glucides liés à O (groupe glycol de la sérine, de la thréonine ou de l'hydroxylysine) ; b) les glucides liés à N (groupe amide de l'asparagine). La structure de ces glucides est différente *(fig. VII-20)*.

Nous prendrons comme exemple l'accrochage des *glucides liés à l'asparagine* (glucides N-liés). *Le précurseur de tous les glucides liés à N est commun pour toutes les cellules : c'est un oligosaccharide comprenant 14 résidus glucidiques dont le mannose est un sucre très majoritaire*. Ce précurseur lié à 2 phosphates, donc « activé », et fixé à un élément lipidique de la membrane du RER est transféré *en bloc* à la chaîne polypeptidique en cours d'élongation. La liaison se fait grâce à une *glycosyl-transférase* et aux dépens de l'énergie contenue dans les liaisons phosphate *(fig. VII-21)*.

On peut distinguer deux régions dans l'antenne glucidique :

– une **région proximale**, qui ne sera pas changée ; elle est définitive ;

– une région **terminale**, riche en mannose et en glucose, qui sera remaniée *(fig. VII-22, A)*.

Dans l'appareil de Golgi les protéines glycosylées subissent des transformations portant sur la structure et la composition de l'oligosaccharide. Par ***l'action séquentielle de glycosidases*** qui élaguent (par exemple des mannosidases) et de ***glycosyl-transférases*** qui accrochent des sucres (galactose, fucose, NANA), la région

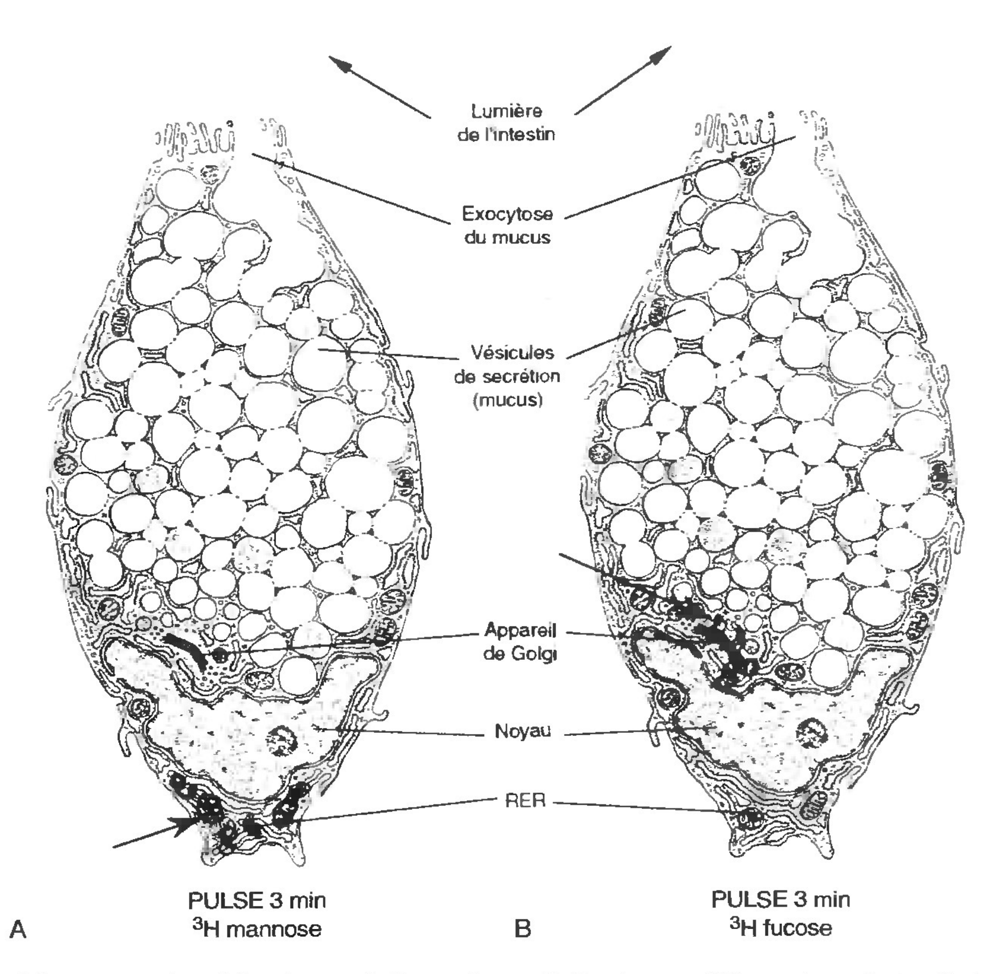
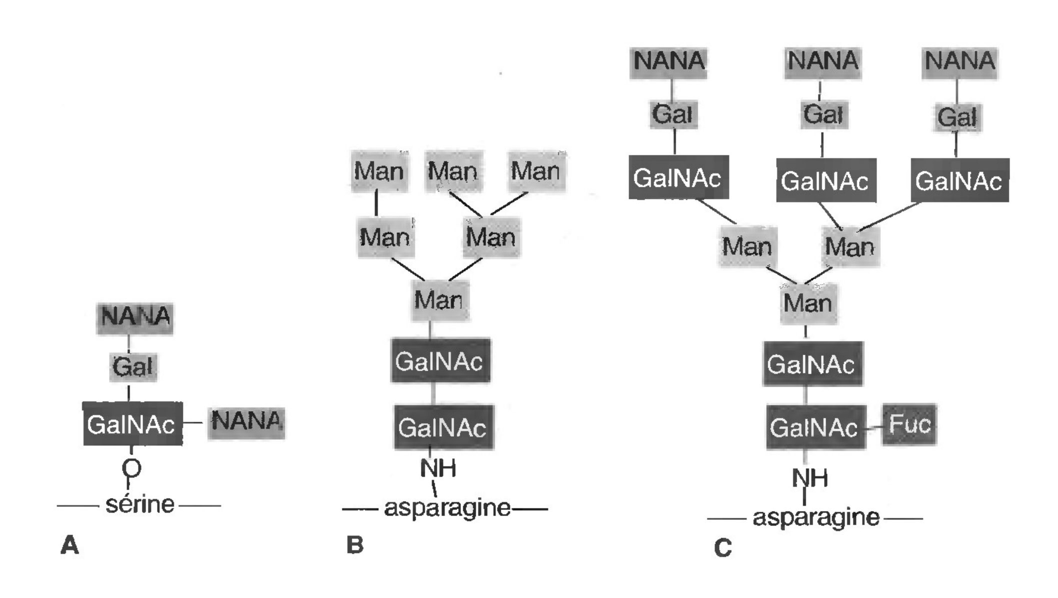


Fig. VII-19 : Expérience montrant la glycosylation séquentielle des protéines dans les cellules de l'intestin spécialisées dans la sécrétion du mucus.

A) Après un pulse de 3 minutes dans du mannose tritié.
B) Après un pulse de 3 minutes dans du galactose tritié.
Les flèches indiquent la position des grains d'argent, donc le niveau d'incorporation des précurseurs.
(*Schémas reproduits d'après la figure 80 de T.L. LENTZ. An atlas of drawing of whole cell structure. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1971.)*

Fig. VII-20 : Structure d'oligosaccharides liés à N et à O.

A) Oligosaccharide lié à O (oxygène des groupes hydroxyles de la sérine, ou de la thréonine).
B) Oligosaccharide lié à N (azote amide de l'asparagine), type à mannose prédominant.
C) Oligosaccharide lié à N, type complexe.
NANA, N-acétylneuraminate ; Gal, galactose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; GalNAc, N-acétylgalactosamine ; Man, mannose ; Fuc, fucose.



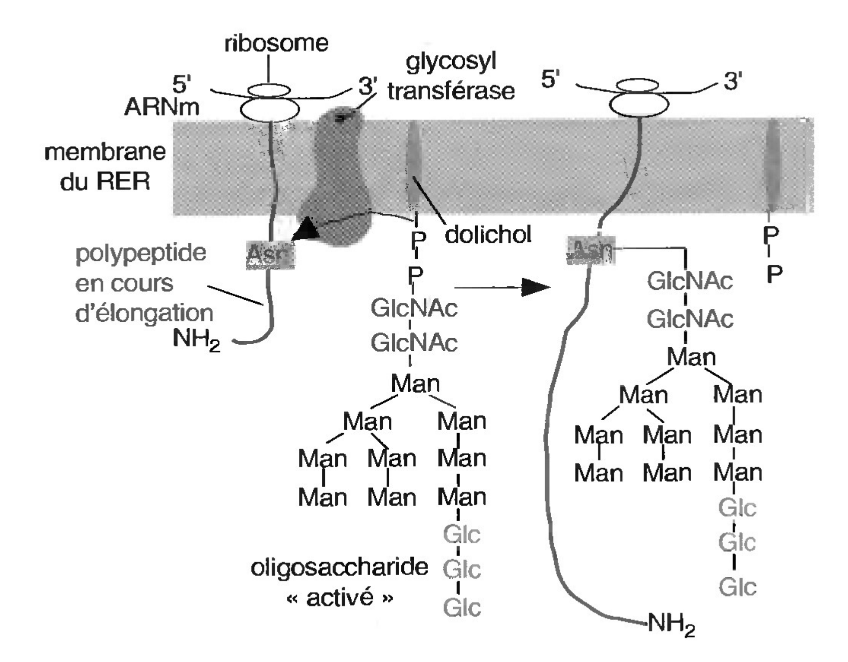


Fig. VII-21 : Glycosylation dans le RER. Transfert catalytique en bloc d'un oligosaccharide activé du dolichol (son transporteur) au résidu asparagine d'un polypeptide en cours de synthèse.

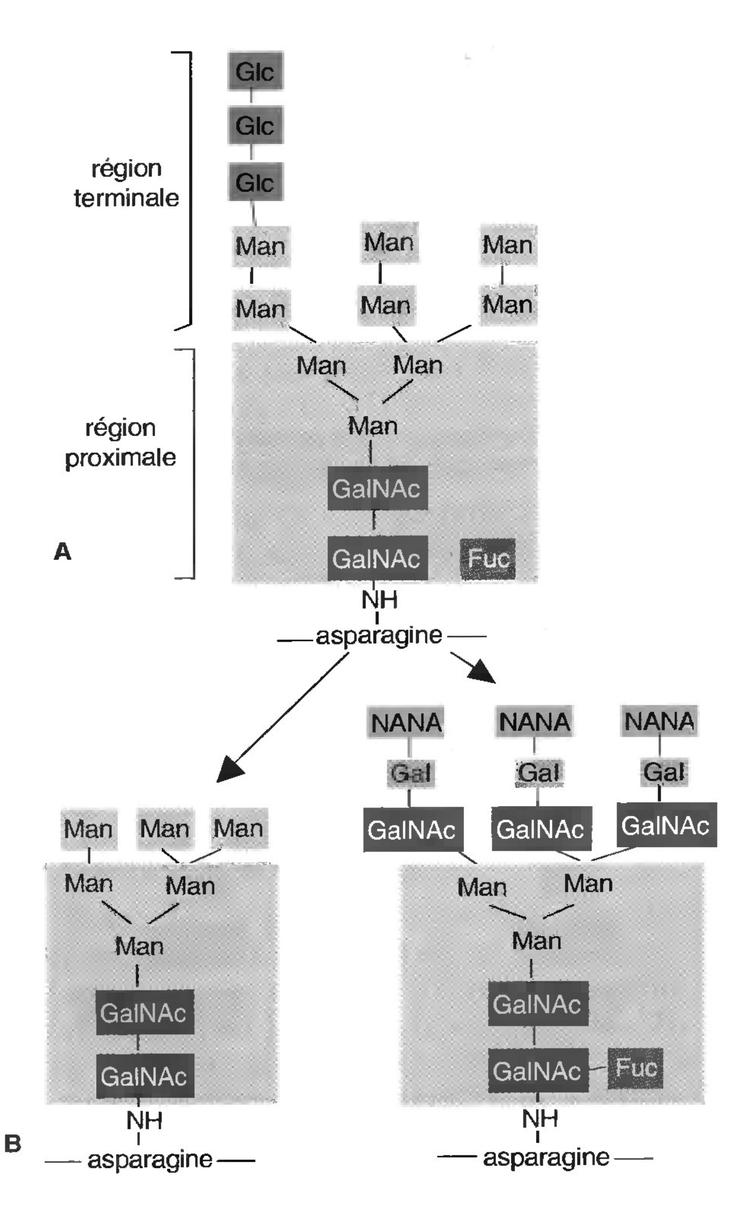


Fig. VII-22 : Exemples de modifications des oligosaccharides par élagage et addition de nouveaux sucres.

A) Motif oligosaccharidique transféré en bloc pendant la synthèse sur le RER (voir figure VII-21) ; il comprend une région proximale (en grisé) définitive et une région terminale qui sera remaniée.

B) Oligosaccharides matures après remaniements dans l'appareil de Golgi.

terminale est transformée de façon très spécifique et programmée *(fig. VII-22, B)*. En effet, cette transformation provient de l'intervention dans un ordre déterminé d'enzymes qui reconnaissent pour substrat le produit de la réaction précédente. C'est donc la spécificité des enzymes insérées dans les membranes (codées par le génome nucléaire) qui définit le type d'oligosaccharide mis en place. Il a été montré que l'**élagage** intervenait dans la face *cis* et surtout dans le compartiment médian de l'appareil de Golgi, alors que l'addition de nouveaux sucres (par les galactosyl-transférases, les fucosyl-transférases...) intervenait sur la face *trans* de l'appareil de Golgi *(fig. VII-23)*. ***Contrairement à ce qui a été vu pour les protéines, la séquence oligosaccharidique est donc obtenue non pas à l'aide d'une matrice mais grâce à l'activité séquentielle et coordonnée de plusieurs systèmes enzymatiques fixés sur les membranes des compartiments***.

• Sulfatation

Par des expériences d'autoradiographie avec du soufre marqué on peut aussi visualiser les niveaux où des groupements sulfate sont accrochés à des protéines. Ainsi en utilisant l'isotope ^{35}S on peut observer un marquage dans les dictyosomes des cellules à mucus ; quand elle a lieu, la sulfatation des protéines se fait aussi dans l'appareil de Golgi grâce à l'intervention de sulfo-transférases liées à la membrane dans la face *trans (fig. VII-23)*.

• Accrochage des groupements phosphate

On verra dans le paragraphe suivant consacré à la biogenèse des lysosomes que l'accrochage de groupements phosphate sur certaines protéines dès l'appareil de Golgi va déterminer leur transit obligatoire vers le compartiment lysosomal.

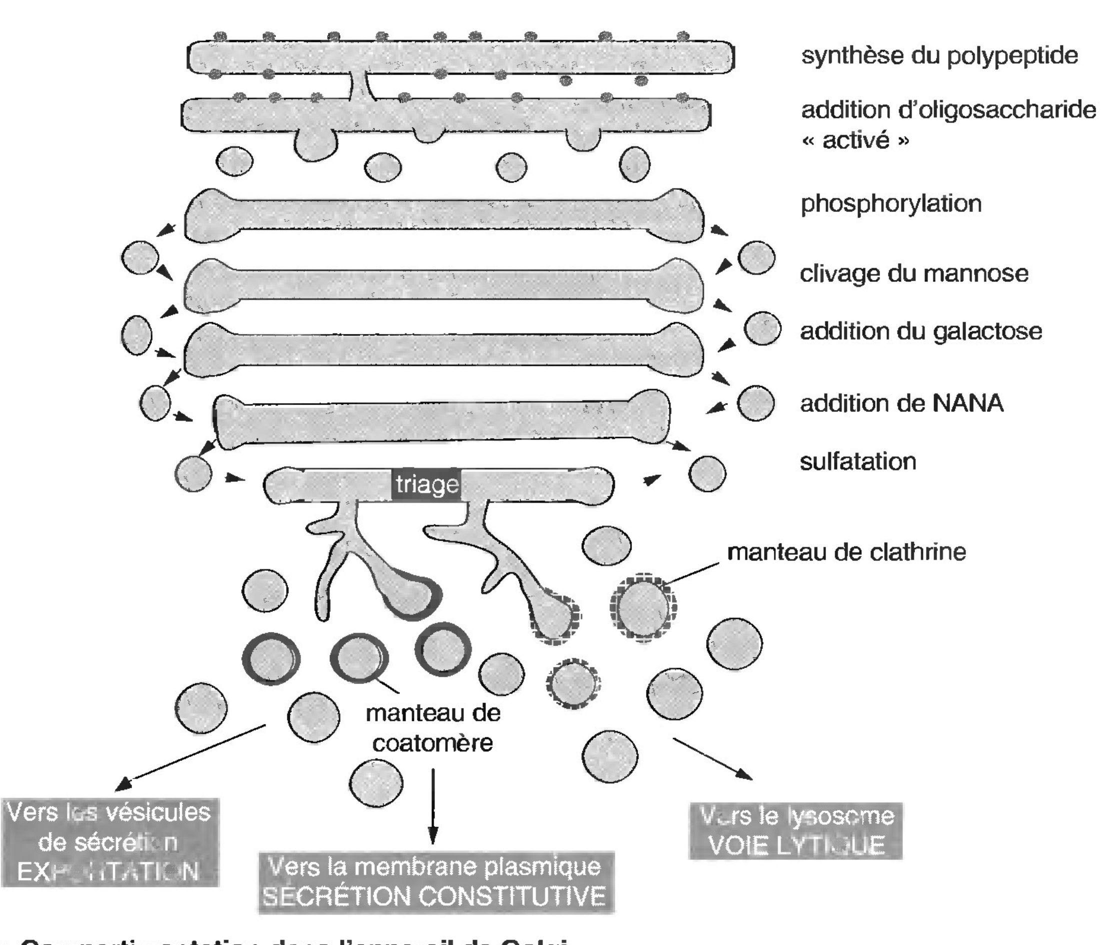


Fig. VII-23 : Compartimentation dans l'appareil de Golgi.
Quelques étapes de maturation et les trois principales destinations après tri dans la face *trans* du dictyosome et le réseau trans-golgien.

D. Adressage des protéines

Il est admis que la glycosylation des protéines sert probablement de moyen de protection de celles-ci contre d'éventuelles attaques enzymatiques au cours de leur transit. Mais le rôle le plus important des chaînes latérales glycosylées est sans doute de permettre l'*adressage des protéines vers la bonne destination*. L'appareil de Golgi est considéré comme un **centre de tri** à partir duquel 3 voies principales peuvent être suivies par les protéines dans les cellules animales *(fig. VII-23)*:

– l'**exportation** à l'extérieur de la cellule. Elle se fait par des vésicules souvent couvertes de clathrine qui bourgeonnent sur la face *trans* des dictyosomes (TGN), perdent ensuite leur revêtement de clathrine et peuvent ensuite fusionner avec le plasmalemme pour permettre l'exocytose. C'est le cas analysé précédemment de l'insuline, c'est le cas de beaucoup d'enzymes digestives. Les séquences oligosaccharidiques servent d'**étiquette** pour cet adressage ;

– l'incorporation à la membrane plasmique pour en permettre le recyclage : c'est ce que l'on appelle la **sécrétion constitutive**. Pour cette voie très importante (elle permet le renouvellement de la membrane plasmique) le code d'adressage n'est pas parfaitement connu. Il est possible que cette voie corresponde à un adressage par défaut d'étiquette. Les vésicules de transport possèdent généralement un manteau de coatomère ;

– la **voie lysosomale,** ou voie lytique pour laquelle l'étiquette, on le verra, est un mannose-6-phosphate. Les vésicules de transport de cette voie sont couvertes de clathrine.

Dans les cellules qui présentent une nette polarité, c'est probablement aussi au niveau de l'appareil de Golgi que se fait le tri entre les protéines destinées au pôle apical et celles destinées au pôle basolatéral.

Dans les cellules végétales, les modalités d'adressage sont sensiblement différentes *(fig. VII-24)*. Au départ, comme dans les cellules animales, les protéines sont synthétisées sur le RER et délivrées dans les citernes de celui-ci grâce à une séquence signal. C'est au moment du « triage » que les événements sont différents. Il apparaît en effet que c'est par *défaut de signal* (donc non pas grâce aux antennes oligosaccharidiques) que les glycoprotéines à destinée extracellulaire sont acheminées à la surface cellulaire. Les glycoprotéines destinées à la vacuole centrale sont en revanche acheminées grâce à un signal : ce n'est pas le mannose-6-phosphate, mais *plus probablement des domaines polypeptidiques au sein de la molécule.*

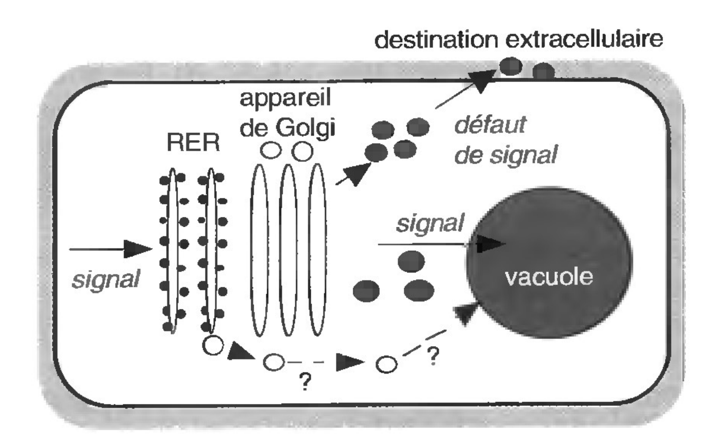


Fig. VII-24 : Adressage des glycoprotéines dans les cellules végétales.
Les protéines, synthétisées sur le RER, passent dans la cavité de celui-ci grâce à une séquence signal. Les glycoprotéines destinées à l'exportation sont acheminées en surface par défaut de signal (les antennes oligosaccharidiques ne servent pas d'étiquette comme dans les cellules animales). Les glycoprotéines destinées à la vacuole portent une information qui leur sert d'étiquette. Cette information est probablement contenue dans des domaines polypeptidiques. Un passage direct du réticulum endoplasmique vers la vacuole *via* des vésicules n'est pas exclu, mais il est encore à démontrer.

2.3. BIOGENÈSE DES LYSOSOMES : UN EXEMPLE DE TRI ET D'ADRESSAGE DES GLYCOPROTÉINES

Les lysosomes, on l'a vu, reçoivent du matériel à dégrader par 3 voies différentes. Une question est de savoir comment se fait la biosynthèse à la fois des hydrolases stockées dans les lysosomes et des protéines qui constituent leurs membranes.

On connaît assez bien les mécanismes qui permettent la synthèse, le transport et l'adres-

sage des **hydrolases lysosomales** dans les cellules animales.

Comme pour les protéines exportables, les hydrolases lysosomales sont synthétisées sur le RER. Grâce à une séquence signal, elles peuvent passer dans la cavité du RER et transiter ensuite par l'appareil de Golgi selon le processus habituel. Les vésicules de transport qui délivrent les protéines vers les lysosomes bourgeonnent du réseau trans-golgien (TGN). Ces vésicules doivent incorporer les protéines lysosomales en excluant les autres. La question est donc de comprendre comment les protéines lysosomales sont reconnues et choisies de façon aussi précise.

A. Les protéines lysosomales sont triées par un récepteur du mannose-6-phosphate

C'est l'accrochage d'un *marqueur* qui donne aux hydrolases lysosomales l'« étiquette » indiquant la bonne adresse à laquelle elles doivent être livrées. Ce marqueur est apparemment le même pour toutes les hydrolases : c'est le **mannose-6-phosphate** (M6P), c'est-à-dire un résidu mannose terminal sur lequel un groupement phosphate a été lié et qui est attaché aux oligosaccharides de ces protéines *(fig. VII-25)*. L'accrochage du marqueur se fait relativement tôt, dès le compartiment *cis* des dictyosomes *(fig. VII-26)*.

—O—oligosaccharide
enzyme lysosomale

Fig. VII-25 : Le mannose-6 phosphate, marqueur des enzymes lysosomales.

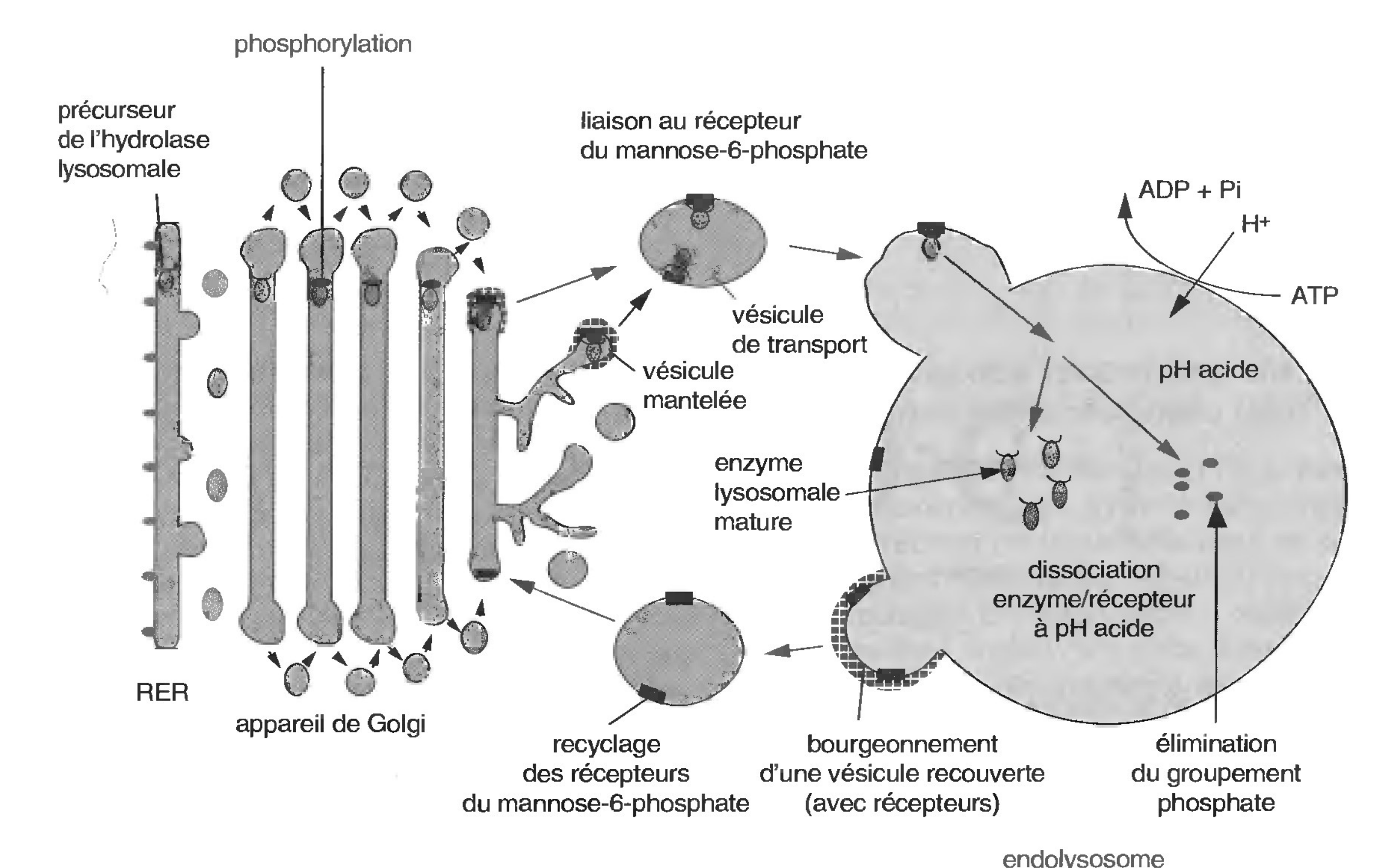


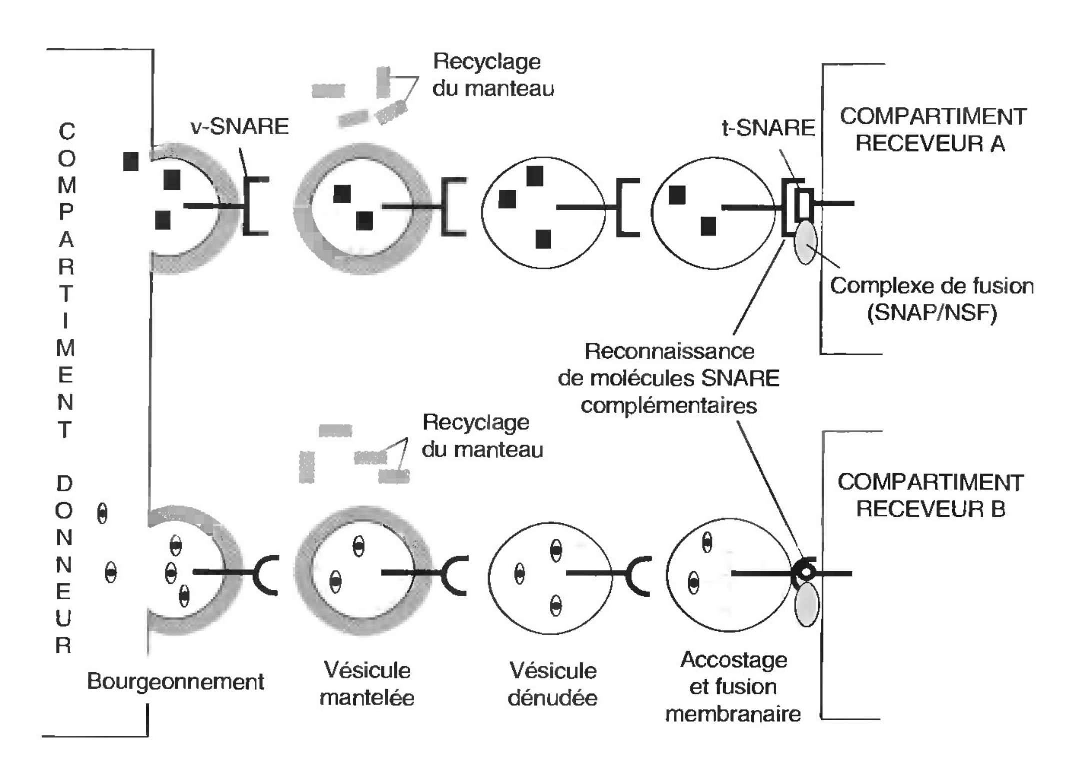
Fig. VII-26 : Biosynthèse des hydrolases lysosomales, adressage aux lysosomes, déchargement et navette des récepteurs.

LE « VOYAGE » SÉLECTIF ET DIRIGÉ DES VÉSICULES ENTRE LES COMPARTIMENTS CELLULAIRES

Parmi les nombreuses questions qui se posent en termes de trafic membranaire, une question importante reste de comprendre quels sont les mécanismes moléculaires qui permettent un transport sélectif et dirigé. En d'autres termes, comment la cellule « décide-t-elle » à chaque instant quelles molécules doivent être transportées et vers quel autre compartiment? On comprend toute l'importance des vésicules de transport qui quittent un **compartiment donneur** après un empaquetage sélectif pour aller vers un **compartiment receveur**. Les mécanismes et les partenaires moléculaires impliqués sont, bien entendu, différents selon les chargements et les destinations. Toutefois nous allons tenter de décrire un scénario relativement général de ces événements.

La majorité des vésicules de transport se forment par **bourgeonnement** à partir de régions spécialisées des membranes du compartiment donneur. Les molécules chargées, souvent appelées cargos, sont incorporées dans des vésicules grâce à une interaction directe ou indirecte avec des protéines cytosoliques qui s'assemblent sur la membrane du compartiment donneur en formant le **manteau**.

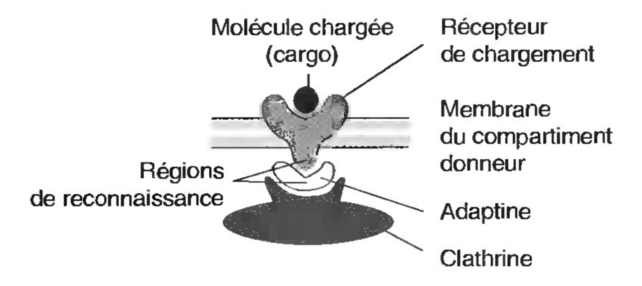
Les vésicules qui émergent sont des **vésicules mantelées**. A ce jour, on admet qu'il existe deux types de vésicules de transport : a) les vésicules recouvertes de **clathrine** qui transportent de façon sélective le matériel destiné aux endosomes et aux lysosomes (voie lytique) mais aussi aux vésicules de sécrétion régulée (voie de l'exportation); b) les vésicules recouvertes d'un autre complexe protéique, le **coatomère**, qui transportent de façon non sélective le matériel vers la membrane plasmique (sécrétion constitutive). Dans les deux cas, l'assemblage du revêtement implique le recrutement de plusieurs protéines (par exemple, les protéines de la famille Rab) et du GTP comme source d'énergie.



Une fois que la vésicule s'est détachée, le manteau est assez rapidement perdu et on parle alors de **vésicules dénudées**. Le mécanisme de dénudation est loin d'être clairement élucidé. D'après des expériences effectuées *in vitro*, il semble qu'une protéine chaperon de la famille de HSP 70 pourrait agir comme ATPase dénudante (voir p. 56). Les concentrations locales en calcium semblent aussi déterminantes pour ce désassemblage. Les molécules du manteau sont alors recyclées dans le cytosol. La dénudation des vésicules est probablement plus précoce pour les vésicules recouvertes de clathrine que pour les vésicules recouvertes de coatomère.

La dernière étape est l'**accostage** de la vésicule de transport et la **fusion** avec le compartiment receveur. Là encore, de nombreux partenaires entrent en jeu qui ne sont pas tous identifiés avec certitude. Une hypothèse actuelle donne une grande importance aux molécules de la famille des **SNARE,** c'est-à-dire des protéines marqueurs d'organites. Ces molécules existeraient en jeux complémentaires sur les membranes des vésicules issues du compartiment donneur (v-SNARE) et sur les membranes du compartiment cible (t-SNARE, *t* pour *target*, cible). L'accrochage de SNARE pourrait faire intervenir des partenaires moléculaires liés à la molécule cargo. La fusion membranaire serait catalysée par d'autres complexes protéiques de fusion (complexes SNAP/NSF par exemple) qui s'assemblent au site d'accostage et contiennent des GTPases monomériques.

Beaucoup de questions restent posées quant à ces différentes étapes. Actuellement, la liste des nouveaux manteaux s'allonge rapidement, de plus en plus de protéines cytosoliques sont en cours d'identification. Le rôle exact des manteaux reste encore discuté. Dans le cas des vésicules recouvertes de clathrine, le rôle pourrait être double : fournir l'énergie nécessaire pour tirer la membrane dans un bourgeon et former la vésicule de transport, contribuer à capturer les récepteurs membranaires spécifiques et les molécules chargées qui leur sont liées. Un rôle important est donné aux **adaptines**, qui constituent un lien, par reconnaissance spécifique, entre le manteau de clathrine et les récepteurs de chargement transmembranaires.



De façon plus générale, il reste encore à comprendre les interactions entre trafic membranaire et cytosquelette dans le guidage des vésicules, ainsi que les mécanismes moléculaires qui permettent la rétention de certaines molécules dans tel ou tel compartiment ou même le retour de molécules mal acheminées. Autant de défis pour les biologistes cellulaires des années à venir.

Les protéines ainsi marquées sont reconnues par des *récepteurs* complémentaires localisés dans les membranes des dictyosomes et tournés vers la face luminale. Après s'être chargés des protéines, ces récepteurs se regroupent, se concentrent sur le réseau trans-golgien en vésicules couvertes de clathrine et bourgeonnent en formant des *vésicules mantelées* spécialisées dans le transport de protéines lysosomales. Au cours de leur transport les vésicules perdent leur manteau et sont dirigées vers les lysosomes avec lesquels elles peuvent fusionner. Cette étape, là encore, fait intervenir d'autres protéines (voir encadré) qui permettent une reconnaissance des membranes entre elles et leur fusion *(fig. VII-26)*.

B. Navette des récepteurs du mannose-6-phosphate (M6P)

Après la fusion des vésicules et de la membrane du lysosome, les hydrolases se dissocient des récepteurs membranaires et sont donc libérées dans la cavité du lysosome où elles peuvent éventuellement « attaquer » les substances à hydrolyser. Cette dissociation est permise par le pH qui règne dans le lysosome. Des expériences *in vitro* montrent en effet que les récepteurs se lient à l'oligosaccharide spécifique à pH 7 et commencent à se détacher à pH voisin de 6 (rappelons que le pH des lysosomes est voisin de 5). Les hydrolases peuvent parfois se détacher dans des vésicules pré-lysosomales, dont le contenu est acide.

Une fois libérés, les récepteurs du M6P se regroupent géographiquement dans le lysosome dans un secteur qui se recouvre de clathrine et bourgeonne en formant une vésicule mantelée. Au cours de la migration les vésicules mantelées perdent leur manteau et peuvent à nouveau fusionner avec les membranes golgiennes dans le TGN, assurant ainsi un **recyclage des récepteurs** *(fig. VII-26)*.

2.4. DIGESTION INTRACELLULAIRE ET DÉTOXICATION

A. *Les lysosomes, estomacs cellulaires*

Grâce aux enzymes qu'ils contiennent, les lysosomes permettent une digestion intracellulaire. Ces digestions sont de deux sortes: les phénomènes d'autophagie ou d'hétérophagie.

• **Phénomènes d'autophagie**

C'est ce qui permet **l'autoentretien des constituants cellulaires.** La digestion se fait dans les vacuoles autophagiques où sont digérées les propres substances de la cellule. Deux voies sont possibles *(fig. VI-27)*:

– invagination de la surface des lysosomes permettant la capture et l'englobement d'un matériel cytoplasmique. C'est un mécanisme fréquemment observé dans les cellules végétales;

– encerclement et isolement d'une portion de cytoplasme par une lame de réticulum endoplasmique. Des hydrolases sont déversées et les différents organites du territoire séquestré sont dégradés (mitochondries, plastes, plages de glycogène...).

La vitesse d'autophagie est surprenante. Dans certains organes, surtout le foie et le rein, l'autophagie est un mécanisme régulier. Ainsi une cellule hépatique détruit en moyenne la majeure partie de son contenu en une semaine. Pour 1 gramme de cellules hépatiques, 1 milliard de mitochondries sont détruites par heure, ce qui signifie que les mitochondries sont renouvelées 15 fois pendant la demi-vie d'une cellule hépatique (soit 150 jours).

Dans d'autres systèmes l'autophagie est un *événement ponctuel.* Elle peut intervenir pour assurer le nettoyage des vieux organites. C'est le cas aussi des tissus ou des organes qui involuent, par exemple lors des métamorphoses des insectes ou des amphibiens. Sous l'influence d'un stimulus hormonal, les organes (en particulier les muscles) sont digérés et les monomères libérés sont récupérés pour la construction de nouveaux tissus. L'autophagie intervient aussi pour assurer la régulation de la sécrétion lors du sevrage des femelles chez les mammifères: la sécrétion du lait continue mais il n'y a plus de décharge; les lysosomes assurent la destruction des grains de sécrétion et même des structures impliquées dans leur synthèse (RER, ribosomes...).

• **Phénomènes d'hétérophagie**

Ce sont les mécanismes de *phagocytose* et de *pinocytose* qui permettent de digérer des matériaux d'origine exogène.

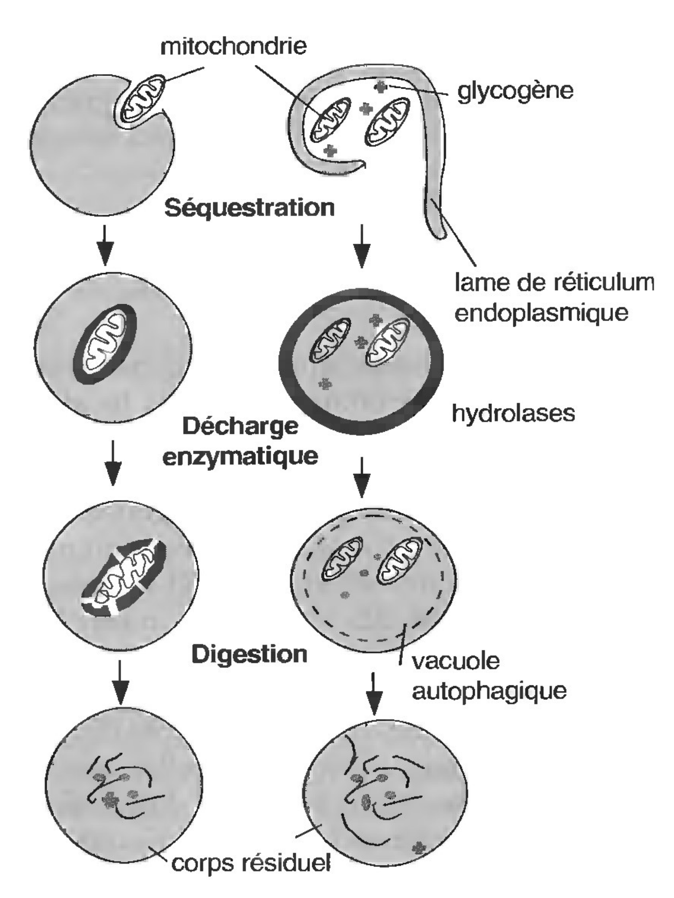


Fig. VII-27: Deux voies de formation des vacuoles autophagiques.

Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la **phagocytose**. Disséminés dans les tissus, en particulier dans les poumons, les macrophages sont spécialisés dans le nettoyage : ce sont les « éboueurs » cellulaires. Après la digestion intra-lysosomale, la cellule récupère les produits de la digestion (acides aminés, sucres, nucléotides...) qui traversent la membrane du lysosome, probablement grâce à des transporteurs.

Quelques bactéries sont irréductibles : c'est le cas des bactéries de la lèpre qui vivent très bien dans les lysosomes, se trouvant ainsi à l'abri des défenses immunitaires.

De nombreux protozoaires se nourrissent de cette façon. Après digestion intracellulaire des matériaux exogènes, les déchets non utilisés peuvent être expulsés par exocytose ou stockés dans la cellule formant des corps résiduels.

La **pinocytose** est un mécanisme très général permettant la réabsorption de protéines, leur dégradation et leur réutilisation par les cellules. C'est le mécanisme qui permet aux cellules rénales des tubes contournés de récupérer les molécules protéiques qui ont filtré dans l'espace urinaire au niveau des glomérules ; de même dans le foie les protéines sont retirées du plasma sanguin, dégradées par les lysosomes et récupérées par les cellules.

L'exemple des cellules folliculeuses de la **glande thyroïde** dans lesquelles la production de l'hormone thyroïdienne est en partie le résultat d'une activité de pinocytose est un bon modèle illustrant les phénomènes d'hétérophagie *(fig. VII-28)*. Le précurseur de l'hormone est la **thyroglobuline**, protéine exportable synthétisée au niveau du RER avec une séquence signal selon les mécanismes précédemment décrits.

La protéine transite dans les compartiments intracellulaires où elle subit une maturation (en particulier des glycosylations) et s'accumule dans la lumière des follicules. Dans cette région la thyroglobuline subit une *iodination* c'est-à-dire que de l'iode est attaché aux résidus tyrosine) : elle constitue ce que l'on appelle le **colloïde** formé de thyroglobuline inactive. Sous l'influence de stimuli hormonaux (action de l'adénohypophyse) la thyroglobuline est internalisée par pinocytose, stockée dans des vésicules formant des gouttes de colloïde intracellulaires, déversées dans des endolysosomes qui reçoivent des hydrolases du réseau trans-golgien. Dans les lysosomes matures la dégradation de la thyroglobuline intervient : elle libère des sucres, des acides aminés et des résidus dipeptidiques de tyrosine iodée qui peuvent sortir du lysosome. Les dipeptides iodés qui constituent **l'hormone thyroïdienne active** franchissent la membrane plasmique de la région basale des cellules et peuvent ainsi entrer dans la circulation sanguine. Dans ce cas il y a donc ***synthèse d'une énorme molécule inactive qui par un système de régulation de type hétérophagique sous contrôle hormonal aboutit à la formation d'un dipeptide actif***.

L'hétérophagie permet dans de nombreux cas un **stockage temporaire des réserves**. Dans les organismes animaux elle intervient dans les œufs. Il a été vu précédemment que dans les œufs la vitellogénine est internalisée dans les cellules par pinocytose et est stockée sous la forme de phosphoprotéines dans des systèmes clos formant les grains de vitellus. Ces réserves ne sont pas utilisées directement par l'embryon mais sont dégradées dans les lysosomes quand cela est nécessaire libérant ainsi des acides aminés phosphatés directement utilisables.

Dans les organismes végétaux les graines accumulent aussi des réserves, par exemple dans des *grains d'aleurone* (vacuoles fragmentées et déshydratées). Lors de la germination des graines, l'hydratation entraîne la digestion lysosomale de ces réserves qui deviennent là aussi utilisables par l'embryon.

B. Le réticulum endoplasmique et la détoxication

Il existe toute une masse de produits insolubles dans l'eau, donc ne pouvant pas être éliminés par voie rénale, qui risquent donc de s'accumuler dans les cellules. Il est donc nécessaire qu'existe un système de détoxication sinon ces produits seraient accumulés et dangereux. Il s'agit des insecticides, des colorants, des conservateurs et de nombreux

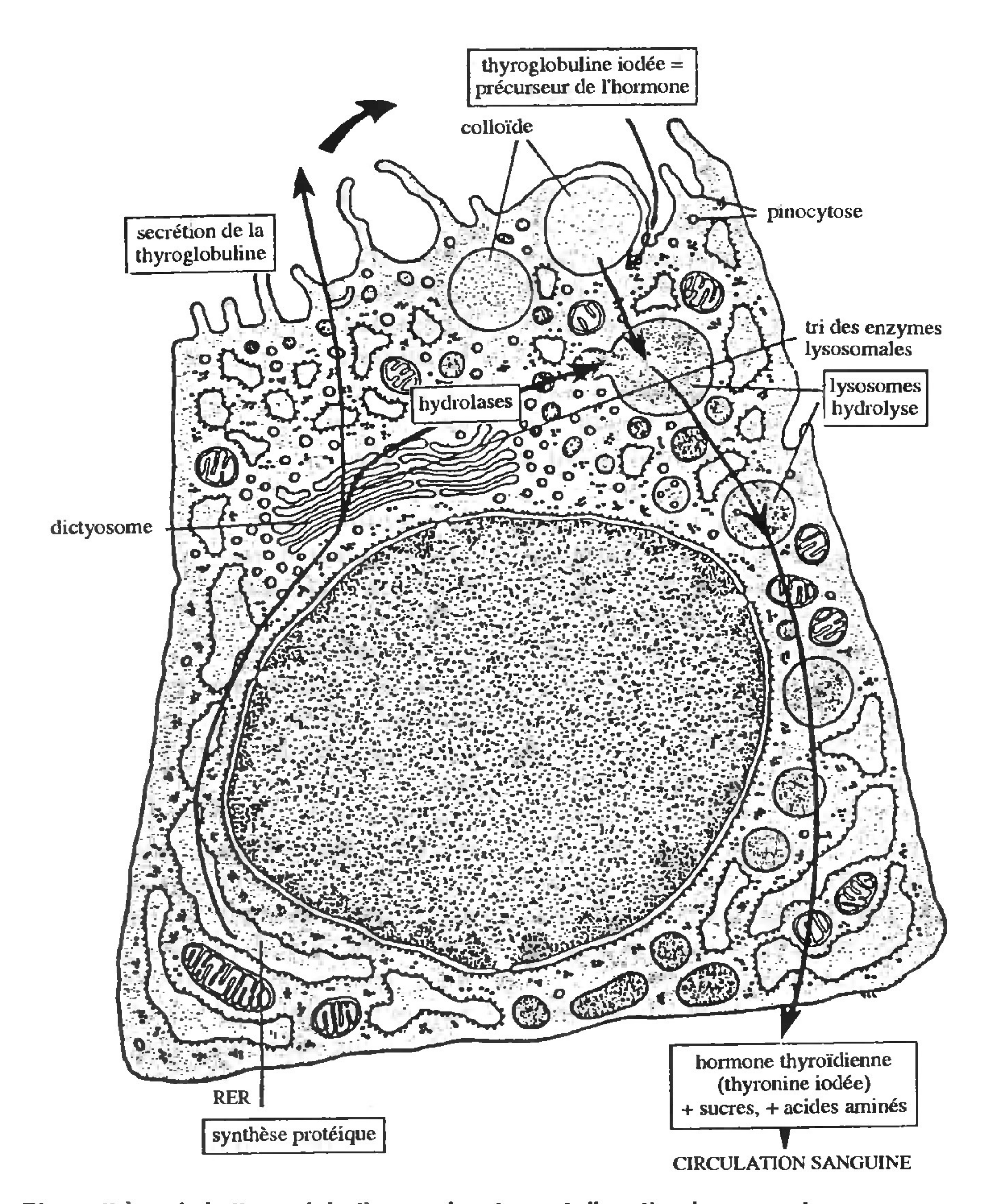


Fig. VII-28 : Biosynthèse de la thyroglobuline, endocytose et digestion lysosomale.
(Schémas reproduits d'après la figure 142 de T.L. LENTZ. An atlas of drawing of whole cell structure. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1971.)

médicaments. Certains organes sont plus spécialisés dans cette détoxication (foie, peau, reins) et dans ces organes la détoxication intervient au niveau du réticulum endoplasmique.

C'est ainsi par exemple qu'un barbiturique, le *phénobarbital*, molécule totalement insoluble, peut être hydroxylé grâce à l'action du cytochrome P450 présent sur la face cytosolique des membranes du réticulum endoplasmique (dans des cellules hépatiques en particulier). Après hydroxylation la molécule est hydrosoluble et est donc plus facilement éliminée *(fig. VII-29)*.

Dans les cellules qui effectuent une telle détoxication le réticulum endoplasmique lisse est particulièrement développé. Une conséquence de la stimulation de la détoxication peut être une perturbation du métabolisme des hormones sexuelles. On se souvient de l'augmentation de stérilité des oiseaux à des périodes où les insecticides étaient utilisés sans discernement...

PHÉNOBARBITAL

HN, C, C_2H_5, C, C, C, N, H, O, O, H

+

H^+ + NADPH + O_2

cytochrome P450

HYDROXYLATION

HN, C, C_2H_5, C, C, C, N, H, O, O, OH

groupement hydroxyle

+

H_2O + $NADP^+$

Fig. VII-29 : Détoxication du phénobarbital par hydroxylation.

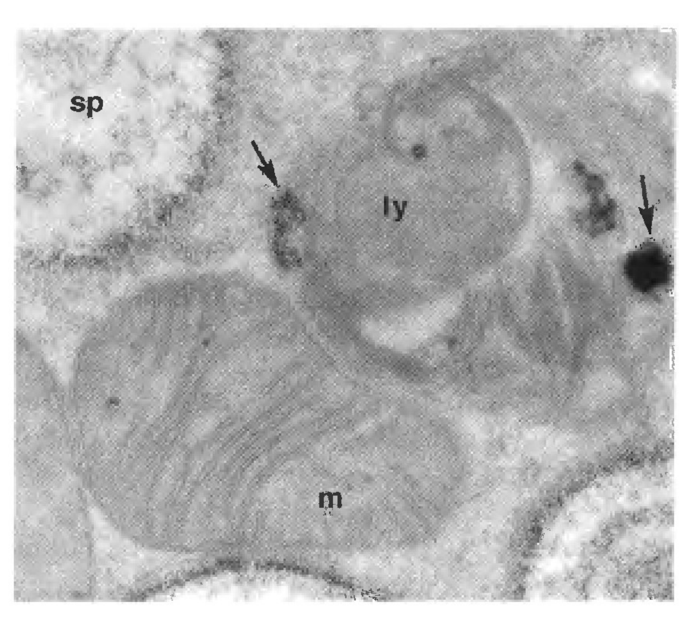


Fig. VII-30 : Accumulation de mercure dans les lysosomes.
Cellules intestinales d'un Insecte (*Blatella*) après intoxication par le méthylmercure. Dans le lysosome (ly) on remarque l'abondance d'inclusions opaques et de microgranules (flèches) riches en mercure. Elles contiennent aussi du zinc et du cuivre ; m, mitochondries ; sp, sphérocristaux ; G. x 40 000.
(*Cliché A.Y. JEANTET.*)

C. Accumulation de produits toxiques dans les lysosomes

Dans certains cas les lysosomes peuvent devenir de véritables « poubelles cellulaires ». Un problème est celui du *recyclage des membranes cellulaires*. Peu de lipases existent et, dans de nombreuses cellules, en particulier dans les cellules qui se renouvellent peu les lipides des membranes s'accumulent et bloquent en quelque sorte les lysosomes. C'est ainsi que dans les cellules altérées ou sénescentes de la peau on voit apparaître des *pigments de vieillesse* formés par des résidus bruns indigestes des lysosomes.

Les lysosomes sont aussi les organites dans lesquels s'accumulent de nombreux déchets, par exemple les déchets à base de mercure *(fig. VII-30)*. Les organismes marins concentrent particulièrement ces déchets dans leurs lysosomes. C'est la raison pour laquelle ils sont déconseillés dans l'alimentation en cas de pollution car ils peuvent provoquer de graves intoxications.

2.5. LYSOSOMES ET PATHOLOGIE

Nombreuses sont les maladies qui sont dues à un dysfonctionnement des lysosomes. Elles sont de plusieurs types.

- **Rupture de la membrane des lysosomes**

L'exemple le plus classique est celui de la maladie de la **goutte**. Elle atteint les hommes adultes et les femmes ménopausées. Elle est due à un trouble du métabolisme des purines qui provoque des précipitations de cristaux d'urate de sodium dans le liquide synovial des articulations. Les cristaux sont phagocytés par les leucocytes et s'accumulent dans des vacuoles de phagocytose qui reçoivent les hydrolases du réseau trans-golgien. Entre le cristal d'urate et la membrane du lysosome il s'établit des liaisons hydrogène qui ancrent fermement le cristal sur la membrane. Celle-ci ne peut plus se déformer librement et les mouvements du leucocyte provoquent la rupture des membranes du lysosome, la libération

dans le cytoplasme des enzymes lysosomales et la destruction des cellules. Les enzymes se trouvent ainsi libérées dans le liquide synovial entraînant des inflammations caractéristiques et douloureuses.

La thérapie de cette maladie en période de crise implique donc l'utilisation d'anti-inflammatoires (par exemple les corticoïdes) dont la fonction est de stabiliser la membrane des lysosomes et de la colchicine* dont l'intérêt est dû à son pouvoir de dépolymériser les microtubules interdisant ainsi le déplacement des phagocytes vers le lieu où sont accumulés les cristaux d'urate.

Parmi les autres maladies de ce type citons la **silicose** des mineurs, des travailleurs en bâtiment et des meuniers qui absorbent les particules de silice des grains de céréales qu'ils broient. Il s'agit d'absorption de particules de silice par les voies respiratoires. Une phagocytose de ces particules est assurée par les macrophages qui nettoient les bronches. Les cristaux de silice s'accumulent, percent les membranes des lysosomes; la libération des enzymes lysosomales provoque une inflammation qui se complique du fait d'une stimulation de la synthèse de collagène dans les bronches. Les bronches deviennent alors tapissées de collagène ce qui rend difficiles les échanges gazeux et la respiration.

L'**asbestose** est aussi une maladie due à la rupture des membranes des lysosomes par des particules d'amiante.

- **Maladies de surcharge**

Ce sont les maladies, souvent héréditaires, provoquées par la déficience (ou l'inactivation) d'enzymes lysosomales. Elles peuvent aboutir à l'accumulation dans les lysosomes des substrats de ces enzymes qui ne peuvent être hydrolysés. C'est le cas de la maladie de Pompe, due à l'inactivation d'une maltase acide, qui provoque une accumulation de glycogène dans le lysosome. C'est le cas aussi de la maladie de Tay-Sachs dans laquelle le système nerveux est empoisonné par l'accumulation d'un glycolipide dans les lysosomes des neurones à la suite de la déficience d'une enzyme, la N-acétyl-hexosaminidase. Les conséquences en sont importantes sur le plan moteur.

Ces maladies conduisent souvent au décès d'individus jeunes. La thérapie est difficile. On tente de fournir à l'organisme les enzymes qui font défaut.

2.6. LA VACUOLE DES CELLULES VÉGÉTALES COMME COMPARTIMENT DE STOCKAGE

La vacuole des cellules végétales contient de très nombreux composés. Ce sont des ions, des *composés du métabolisme primaire* (acides carboxyliques, glucides, acides aminés, protéines...). Ces composés sont souvent stockés temporairement, comme mis à l'écart des voies du métabolisme cytoplasmique. Il existe aussi des composés beaucoup plus complexes, réunis sous le nom de *composés du métabolisme secondaire*, et qui résultent de voies métaboliques très spécialisées. Ce sont par exemple des composés phénoliques, des pigments qui donnent leur couleur aux végétaux et servent de signaux d'attraction, des tanins, des alcaloïdes, composés qui s'accumulent en général de façon durable dans la vacuole. La vacuole, en plus de ses propriétés hydrolytiques est donc un ***compartiment de stockage*** important pour les cellules. Nous n'entrerons pas dans le détail de cette fonction car les spécialisations sont très nombreuses dans les différents types végétaux. Pendant très longtemps beaucoup de ces composés ont été considérés comme des déchets, par conséquent stockés dans un compartiment « poubelle ». Les données récentes montrent qu'il faut repenser cet aspect. En effet il est apparu que ces composés, certains d'entre eux tout au moins, étaient probablement impliqués dans ***les stratégies de défense des plantes face aux prédateurs herbivores***. L'exemple du sorgho, une Graminée d'Afrique, est à ce titre tout à fait significatif *(fig. VII-31)*. Dans les tiges, les

* La colchicine était déjà utilisée par les Égyptiens pour réduire l'intensité des crises de goutte.

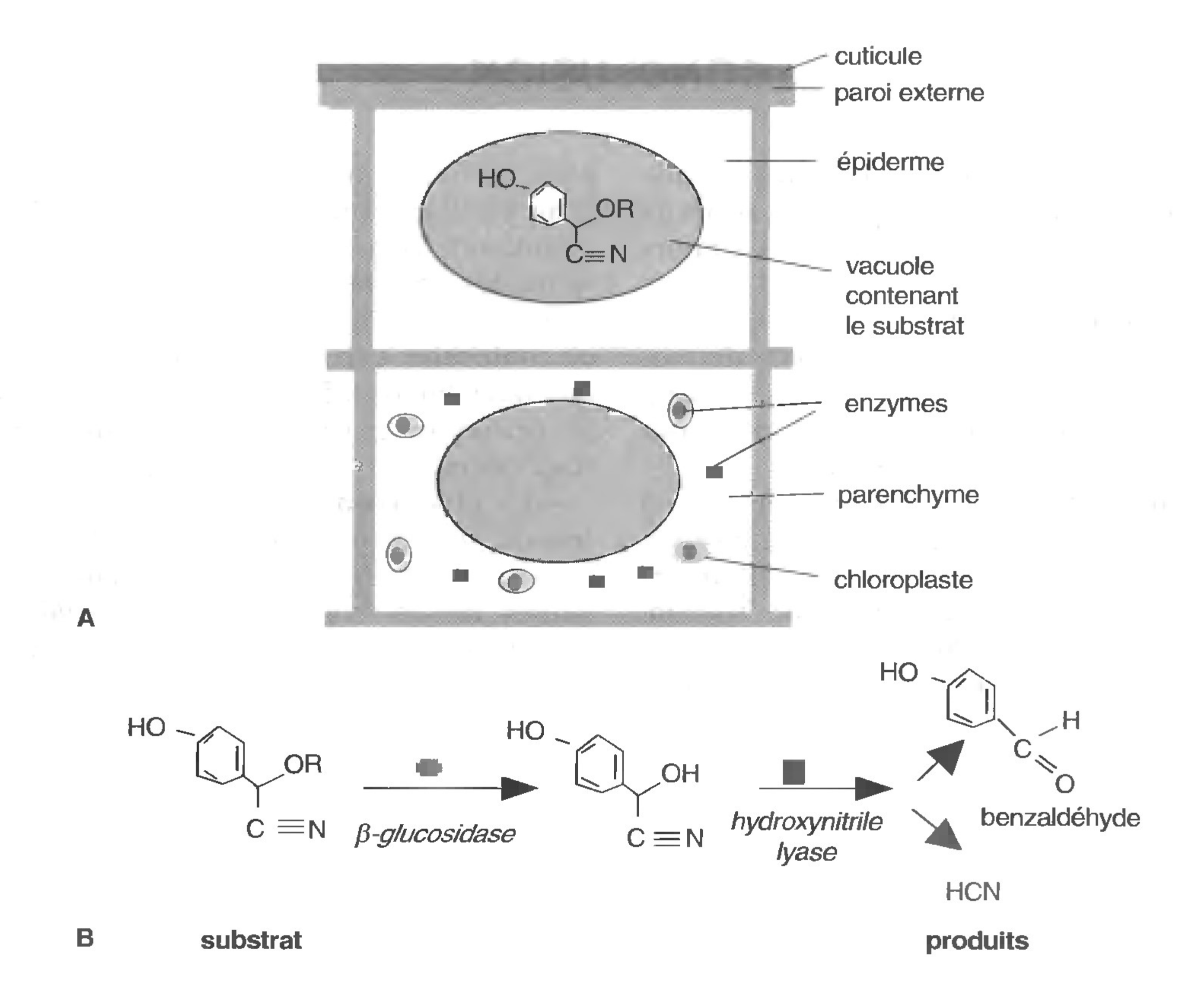


Fig. VII-31 : Compartimentation d'un glycoside cyanogénétique dans le Sorgho et de ses enzymes hydrolytiques.

Tige de sorgho. Cellules épidermiques et cellule de parenchyme cortical.

A) Localisation et compartimentation du substrat et des enzymes dans des cellules voisines.

B) Réaction enzymatique conduisant à la libération du cyanure.

(D'après la fig. 8 de M. WINK. The plant vacuole : a multifunctional compartment. J Exp Botany 1993 ; 44 : 231-246.)

cellules épidermiques contiennent en effet un glucoside cyanogénétique qui est stocké dans la vacuole. Les cellules épidermiques n'ont pas l'équipement enzymatique susceptible de dégrader ce composé potentiellement dangereux. En revanche, cet équipement est présent dans les cellules voisines, localisé dans les plastes et le cytoplasme. Lorsque la plante est blessée, par exemple après broyage et mastication à la suite d'une agression par un herbivore, le glycoside est hydrolysé ce qui a pour effet de libérer de l'acide cyanhydrique, un inhibiteur violent de la respiration cellulaire, donc un poison pour le prédateur. À partir d'exemples de ce type, on mesure la signification biologique du stockage vacuolaire et l'importance de la compartimentation pour la cellule.

CONCLUSION

Les compartiments intracellulaires constituent un énorme réseau dynamique dans lequel les interconnexions sont très importantes.

Il existe dans les cellules eucaryotes deux autres classes d'organites, sans doute dérivés du réticulum endoplasmique (bien que cela soit actuellement remis en question) et qui jouent des rôles distincts. Ce sont :

– les **peroxysomes**, organites de 0,15 à 0,25 µm de diamètre, qui contiennent des enzymes oxydatives et sont dans la cellule des sites pour l'utilisation de l'oxygène. Ils sont en particulier responsables de la dégradation des acides gras en acétyl CoA récupérable pour le fonctionnement des mitochondries (voir le chapitre suivant consacré à l'énergie cellulaire). Dans certaines cellules animales, telles les cellules du foie, les peroxysomes pourraient être responsables de la détoxication de molécules variées, par exemple l'éthanol que nous buvons. Dans les cellules végétales, les peroxysomes sont impliqués dans la photorespiration ;

– les **glyoxysomes,** qui sont un cas particulier de peroxysomes dans les cellules végétales. Très nombreux dans les graines oléagineuses, ils sont impliqués dans le métabolisme des graisses qu'ils peuvent convertir en glucides.

CHAPITRE VIII

La récupération de l'énergie dans la cellule

Les lois de la thermodynamique permettent de prévoir l'évolution d'un système ; elles établissent que la cellule est un système ouvert, échangeant de l'énergie avec l'extérieur. La synthèse du matériel organique, indispensable à la croissance et au fonctionnement cellulaires, nécessite en effet *un apport constant d'énergie*, car ces réactions sont endergoniques, et *de pouvoir réducteur*, car dans la plupart des synthèses, les substrats utilisés sont sous forme oxydée.

Nous avons vu, dans la première partie consacrée à la biochimie structurale, que les transferts d'énergie dans les cellules étaient dévolus à des nucléotides triphosphate susceptibles de stocker temporairement l'énergie libre dans des liaisons anhydride phosphorique, le principal de ces nucléotides étant l'adénosine triphosphate, ***l'ATP***.

Plusieurs sources d'énergie sont exploitées par les cellules pour récupérer cet ATP ; nous les étudierons successivement.

1. UNE VOIE UNIVERSELLE DE PRODUCTION D'ATP : LA GLYCOLYSE

La glycolyse *(fig. VIII-1)* peut être définie comme la suite des réactions qui convertissent le glucose en pyruvate avec production d'ATP. **Toutes ces réactions se produisent dans le cytosol.**

1.1. UNE PREMIÈRE ÉTAPE, LA FORMATION DU FRUCTOSE 1,6 BISPHOSPHATE *

C'est généralement à partir du glucose que cette première étape est réalisée. Le glucose peut se trouver sous forme d'un ose simple, absorbé par la cellule, ou être obtenu à partir du glycogène ou de l'amidon dont il est le monomère (voir le chapitre sur les glucides).

Dans le premier cas la réaction initiale correspond au transfert d'un groupement phosphate de l'ATP sur le carbone 6 de l'ose. Cette réaction, catalysée par une phosphorylase, *l'hexokinase*, produit donc du glucose-6P et consomme une molécule d'ATP, libérant un ADP.

* L'appellation bisphosphate est utilisée pour qualifier les composés dont la formule générale est P-R-P (où R est la chaîne carbonée et P les phosphates) afin d'éviter toute confusion avec les composés pyrophosphates, comme l'ADP, P-P-R.

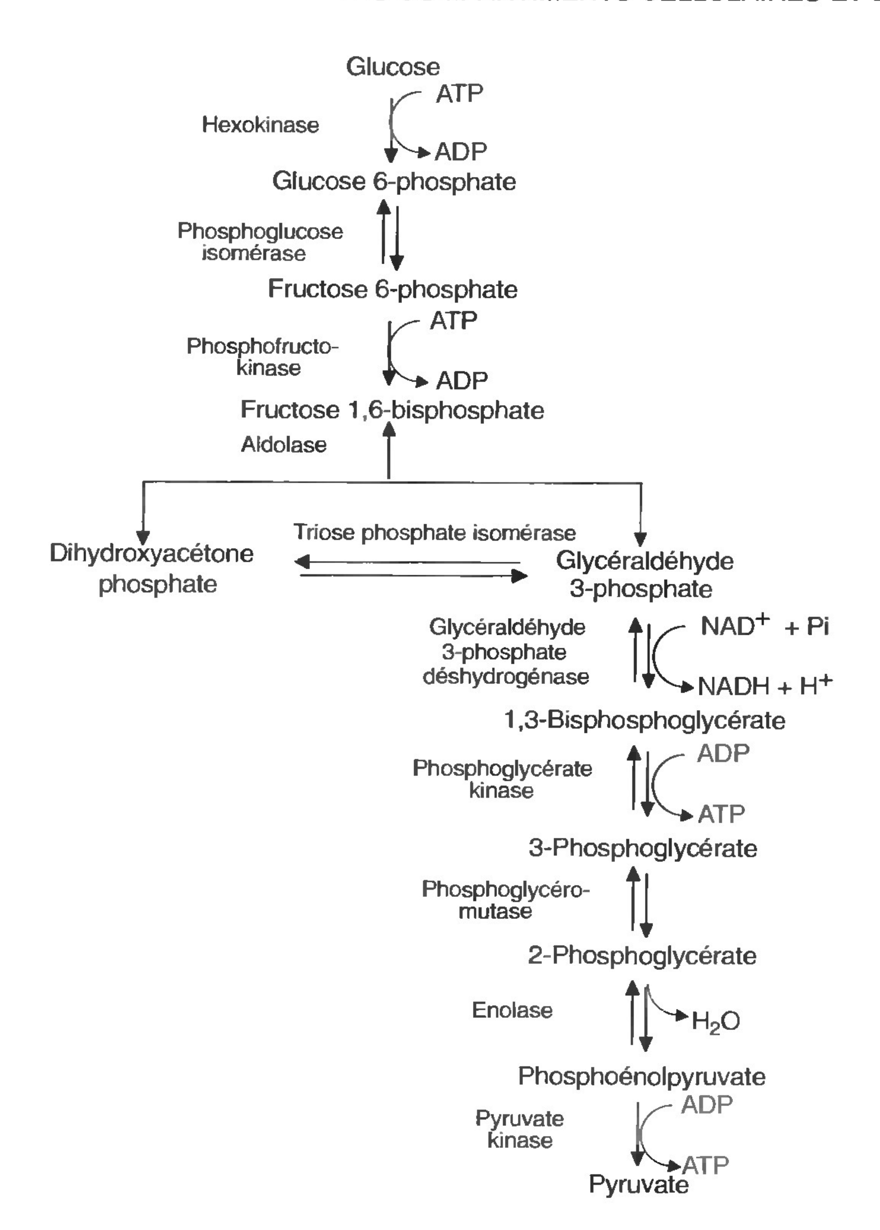


Fig. VIII-1 : Les différentes étapes de la glycolyse.

Dans le second cas, l'hydrolyse du glycogène ou de l'amidon par des enzymes spécifiques libère du glucose phosphate, c'est du glucose 1-P ; une isomérase intervient alors et transforme cet ose en glucose 6-P.

Ce glucose 6-P est isomérisé en fructose 6-P par une enzyme spécifique, une phosphoglucose isomérase ; *elle transforme un aldose en cétose.*

Cet hexose est à nouveau phosphorylé par une kinase qui, utilisant une nouvelle molécule d'ATP, le transforme en fructose 1,6-phosphate, et libère un ADP.

Au cours de cette première étape, un hexose bisphosphorylé est produit et deux ATP sont consommés.

1.2. LE CLIVAGE DU FRUCTOSE 1,6-P EN DEUX TRIOSES-PHOSPHATE

Cette réaction est catalysée par une enzyme spécifique : *l'aldolase.* Elle donne naissance à deux sucres bien connus (voir chapitre sur les glucides, p. 103 et 106) : le glycéraldéhyde-phosphate et le dihydroxyacétone-phosphate.

Les deux trioses s'isomérisent aisément si bien qu'à l'équilibre, les deux sucres ne sont pas en proportions équimoléculaires : il y a 96 % de dihydroxyacétone et 4 % de glycéraldéhyde. *Seul ce dernier est utilisé pour la suite de la glycolyse*, ce qui suppose une transformation continuelle du dihydroxyacétone en glycéraldéhyde.

1.3. DU PHOSPHOGLYCÉRALDÉHYDE 3-P AU PYRUVATE

Sur la *figure VIII-1* sont représentées les différentes étapes aboutissant à la formation de l'acide pyruvique: **CH_3–CO–COOH**, le plus souvent trouvé sous sa forme ionisée, le pyruvate **CH_3–CO–COO^-**.

Dans cette suite de réactions plusieurs points méritent d'être soulignés.

A. L'oxydation du phosphoglycéraldéhyde en 1,3-phosphoglycérate

Rappelons tout d'abord qu'une oxydation peut correspondre à une fixation d'oxygène, à une perte d'hydrogène ou à une perte d'électron.

La réaction aboutissant au 1,3-phosphoglycérate est représentée sur la *figure VIII-2.*

Cette réaction est bien une oxydation, puisqu'elle s'accompagne d'une perte d'hydrogène ($H^+ + e^-$); elle est catalysée par une phosphotriose déshydrogénase. Cette enzyme est constituée d'une partie protéique, l'*apoenzyme*, qui reconnaît le substrat, le phosphoglycéraldéhyde, et d'un *coenzyme*, le *NAD.*

La nicotinamide adénine dinucléotide, NAD, est une molécule formée par l'association de deux nucléotides, dont l'un est constitué à partir de la nicotinamide, bien connue sous le nom de *vitamine PP.*

Acide phosphorique — Ribose — Nicotinamide
|
Acide phosphorique — Ribose — Adénine

Le NAD est actif par le noyau de la nicotinamide qui peut fixer un proton et deux électrons *(fig. VIII-3).* Dans une réaction d'oxydation du type de celle qui figure ci-dessus, on écrira donc:

$$\text{Phosphoglycéraldéhyde} + PO_4H_3 + NAD^+ \rightarrow \text{1,3-bisphosphoglycérate} + NADH + H^+$$

Cette réaction est une réaction d'**oxydoréduction** puisque l'oxydation du substrat, le triose, s'accompagne de la réduction du coenzyme. L'un des protons est libéré dans le milieu.

3-Phosphoglycéraldéhyde

H
|
C = O
|
H — C — OH
|
CH_2 — O — PO_3H_2

PO_4H_3 ↓ → $2\,H^+ + 2\,e^-$

O
||
C — O — PO_3H_2
|
H — C — OH
|
CH_2 — O — PO_3H_2

1,3-Bisphosphoglycérate

Fig. VIII-2: Formation du bisphosphoglycérate.

Nous trouverons dans les pages qui suivent de très nombreuses réactions de ce type; elles jouent un rôle fondamental dans la production d'énergie par les cellules.

Nous verrons également souvent le NAD^+ intervenir dans ces réactions comme coenzyme associé à des apoenzymes différentes, reconnaissant chacune un substrat particulier. ***Le NAD^+ est un coenzyme de déshydrogénase*** très ubiquiste; il constitue dans la cellule un pool utilisé par plusieurs enzymes différentes.

La liaison du phosphate au carbone 1 du glycérate est une liaison riche en énergie créée au cours de la réaction d'oxydation.

Cette énergie va être utilisée par une kinase pour phosphoryler une molécule d'adénosine diphosphate (ADP) constituant ainsi une molécule d'ATP: c'est l'étape suivante qui conduit à la formation du 3-phosphoglycérate.

B. Du phosphoglycérate au pyruvate

La perte d'une molécule d'eau par le glycérate permet la formation d'une fonction

Fig. VIII-3 : La nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), forme oxydée (NAD^+) et réduite ($NADH + H^+$).

énol, riche en énergie. Celle-ci sera, comme dans l'étape précédente, utilisée par une kinase pour phosphoryler une molécule d'ADP et produire une molécule d'ATP, en libérant le pyruvate.

1.4. LE BILAN DE LA GLYCOLYSE ET LE DEVENIR DES PRODUITS FORMÉS

La transformation du glucose en acide pyruvique s'effectue par étapes, donc **sans une libération brutale de l'énergie contenue dans les liaisons**, dont on peut aisément imaginer qu'elle pourrait léser considérablement la cellule.

A. Bilan énergétique

Au point de vue énergétique, le bilan peut s'établir ainsi :

– 1 ATP consommé pour transformer le glucose en glucose 6-P ;

– 1 ATP consommé pour transformer le fructose 6-P en fructose 1,6-bisphosphate ;

– 1 ATP produit lors de l'oxydation du glycéraldéhyde en phosphoglycérate ;

– 1 ATP produit lors du passage du phosphoénolpyruvate au pyruvate.

Comme il y a deux glycéraldéhydes produits à partir d'une seule molécule de glucose (l'un directement, l'autre par isomérisation du dihydroxyacétone), il y a donc 4 ATP synthétisés pour 2 consommés.

Le bilan est donc modeste, 2 ATP seulement. Ce qui signifie qu'une grande quantité d'énergie demeure dans les liaisons des produits de la glycolyse.

B. Devenir des produits de la glycolyse

L'ATP est bien entendu utilisé par la cellule pour ses synthèses ou toute autre activité nécessitant de l'énergie.

En ce qui concerne le pyruvate et le NADH + H^+, il convient de distinguer deux situations.

a. En présence d'oxygène

Dans les cellules eucaryotes, en présence d'oxygène, le pyruvate et le coenzyme réduit sont utilisés par la mitochondrie : le premier entre dans l'organite où il est progressivement dégradé en dioxyde de carbone et eau ; le second, le NADH, est régénéré sous la forme de NAD^+. C'est ce que nous verrons en étudiant la mitochondrie.

Dans les cellules procaryotes les systèmes sont sensiblement différents et quelques exemples seront donnés en fin de chapitre.

b. En l'absence d'oxygène

Dans une cellule procaryote ou eucaryote vivant en conditions anaérobies, le pyruvate et le NADH + H^+ s'accumulent dans le cytoplasme.

En principe, la cellule devrait pouvoir poursuivre la glycolyse puisque celle-ci ne nécessite pas la présence d'oxygène. *Ceci s'avère toutefois impossible par suite du manque très rapide des coenzymes de déshydrogénases oxydés ; si ceux-ci ne sont pas régénérés la glycolyse est interrompue.*

La régénération de ces coenzymes est réalisée par la voie des fermentations. Deux exemples seront donnés :

– L'acide pyruvique peut être transformé en acide lactique ; cette réaction est une réduction qui nécessite un apport d'hydrogène ; celui-ci peut être fourni par la NADH :

$$CH_3\text{–}CO\text{–}COOH + NADH + H^+ \rightarrow CH_3\text{–}CHOH\text{–}COOH + NAD^+$$

– L'acide pyruvique peut également être décarboxylé en acétaldéhyde :

$$CH_3\text{–}CO\text{–}COOH \rightarrow CH_3\text{–}CHO + CO_2$$

Cet acétaldéhyde peut être réduit en alcool éthylique ce qui permet d'utiliser le NADH :

$$CH_3\text{–}CHO + NADH + H^+ \rightarrow CH_3\text{–}CH_2OH + NAD^+$$

Ces fermentations ne produisent pas d'ATP ; elles permettent simplement, en régénérant les coenzymes de déshydrogénases, la poursuite de la glycolyse.

Elles sont cependant d'un intérêt considérable, soit en permettant la poursuite d'une activité biologique comme le fait la fermentation lactique du muscle en anorexie, soit par des utilisations industrielles.

Les fermentations sont en effet utilisées par l'homme depuis la plus haute antiquité soit pour fabriquer certains produits (les levures produisant les boissons alcoolisées par exemple), soit pour en transformer d'autres (le dioxyde de carbone produit par la levure de boulanger au cours de la fermentation permet la levée du pain). Ces fermentations sont cependant des processus qui ne permettent que la poursuite de la glycolyse ; les cellules qui sont contraintes de les mettre en œuvre ont une ressource énergétique très modeste pour assurer leurs synthèses.

2. LA RÉCUPÉRATION DE L'ÉNERGIE CHEZ LES EUCARYOTES

La compartimentation qui a été mise en place chez les Eucaryotes leur a permis de développer, dans des territoires spécialisés, des systèmes de récupération d'énergie qui complètent ou s'ajoutent à celui de la glycolyse, mais qui sont beaucoup plus performants : la *respiration* et la *photosynthèse*.

Respiration et photosynthèse sont réalisées dans des organites limités par une enveloppe, c'est-à-dire par une double membrane : **les mitochondries et les chloroplastes.**

2.1. LES MITOCHONDRIES ET LA RESPIRATION

Les mitochondries se rencontrent ***dans toutes les cellules eucaryotes***, animales et végétales. Elles ont été découvertes à la fin du siècle dernier par ALTMANN. Ce sont des organites très polymorphes, de 1 µm de diamètre environ, dont l'organisation est bien connue depuis l'avènement de la microscopie électronique. L'ensemble des mitochondries d'une cellule constitue le ***chondriome***.

A. Structure

Elle est constante quelle que soit la taille de l'organite.

La mitochondrie *(fig. VIII-4, 5 et 6)* est limitée par deux membranes séparées par un *espace intermembranaire* de 8 à 10 nm d'épaisseur; c'est l'enveloppe. La membrane externe, de 7 à 8 nm, est lisse; la membrane interne, légèrement plus mince (6 nm), beaucoup plus longue que l'externe, dessine à l'intérieur de l'organite des ***replis*** ou ***crêtes***, dont le nombre et l'importance varient selon les cellules. Cette membrane est recouverte sur sa face interne par des particules globulaires de 8 nm de diamètre, pédicellées, les ATP-synthases.

Ces deux membranes délimitent deux compartiments *(fig. VIII-4 et 5)* d'importance et d'organisation différentes.

Le compartiment intermembranaire ne présente pas de différenciation particulière; il est d'épaisseur généralement constante et on n'y décèle aucune forme d'organisation particulière.

La matrice apparaît très dense en microscopie électronique *(fig. VIII-4)*; on y observe divers éléments figurés: 1) des filaments denses, pelotonnés, *associés à la membrane interne*, constitués par de l'ADN et des protéines que l'on nomme, par analogie avec les structures rencontrées chez les bactéries, des *nucléoïdes* *; 2) des granules de 15 à 20 nm, les *ribosomes mitochondriaux* ou *mitoribosomes*; 3) des granules denses plus ou moins volumineux.

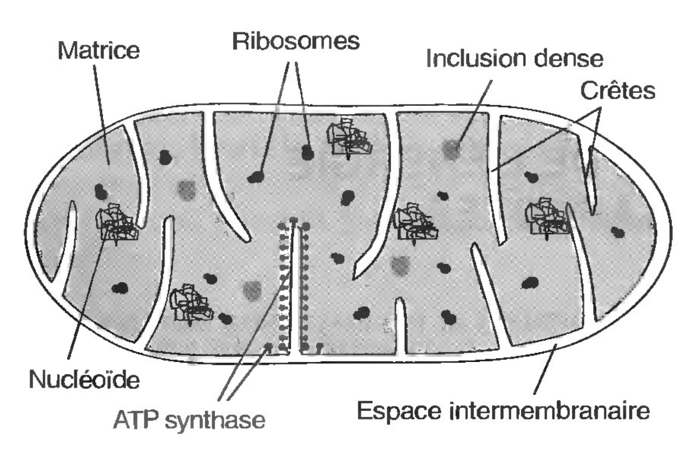


Fig. VIII-4: Mitochondrie.
Représentation schématique d'une coupe ultrafine observée en microscopie électronique.

B. Diversité de l'organisation mitochondriale

La taille et la forme des mitochondries varient très sensiblement selon les types cellulaires et, dans une même cellule, selon son âge et son activité *(fig. VIII-6)*.

Pendant très longtemps on s'est efforcé de distinguer plusieurs types de mitochondries en fonction de leur forme et de leur taille (chondriocontes, chondriomites...). On sait actuellement que cette forme est très variable. En effet, les mitochondries peuvent se diviser ou

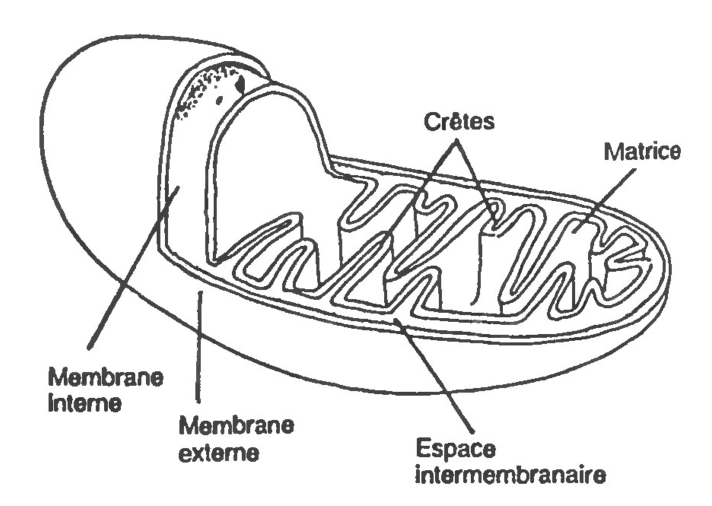


Fig. VIII-5: Reconstitution tridimensionnelle d'une mitochondrie.

* On peut également y trouver des plasmides, à réplication autonome.

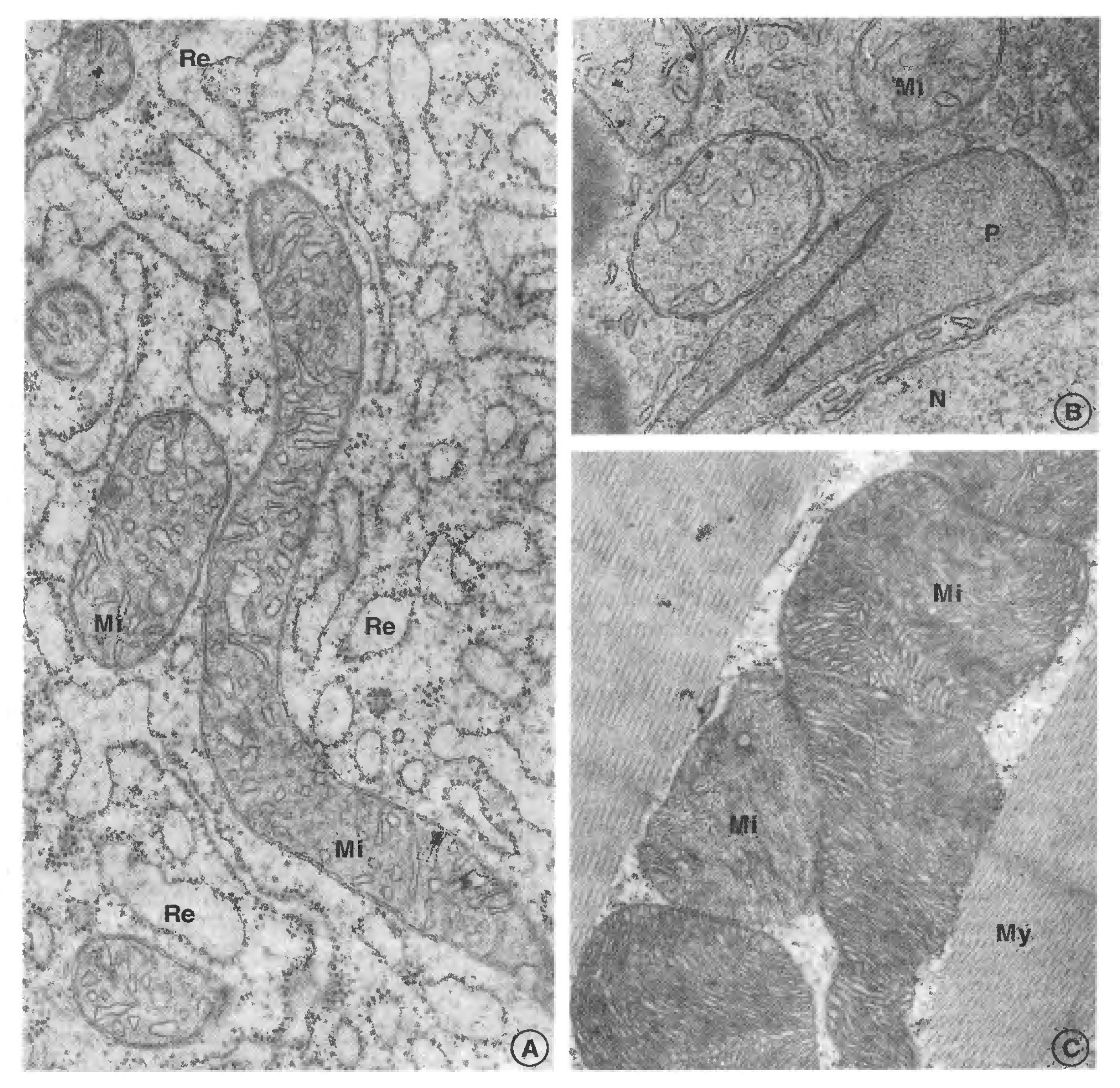


Fig. VIII-6 : Diversité de l'organisation mitochondriale.

A) Mitochondries (Mi) dans une cellule de glande digestive d'huître. G. x 30000.
B) Mitochondrie (Mi) végétale, à crêtes peu nombreuses, dans une spore de ptéridophyte. G. x 34500.
C) Mitochondries (Mi) à crêtes nombreuses dans une cellule consommatrice d'énergie, cellule du muscle alaire de Drosophile. G. x 17500.

My, myofibrilles ; N, noyau ; P, plaste ; Re, réticulum endoplasmique.
(Clichés A et C : A.Y. JEANTET ; cliché B : D. ROBERT.)

fusionner et même ne constituer qu'un seul organite, très ramifié, par cellule.

Les mitochondries se déplacent dans le cytoplasme ; elles sont généralement associées à des microtubules qui guident ces déplacements.

Le nombre des mitochondries dépend de l'activité cellulaire ; elles sont nombreuses dans les cellules consommant beaucoup d'énergie : cellule hépatique, cellule musculaire *(fig. VIII-6, C)*, cellules à déplacement rapide comme les spermatozoïdes.

Cependant, si l'on tient à apprécier à sa juste valeur l'importance du système mitochondrial, il ne faut pas seulement tenir compte du nombre des organites, il faut aussi estimer l'importance des replis internes que forment les crêtes, c'est-à-dire la surface en contact avec la matrice; en effet, plus celle-ci est grande, plus il y a d'ATP formé.

En règle générale, les mitochondries des cellules végétales *(fig. VIII-6, B)*, qui disposent d'un autre apport énergétique (celui fourni par les plastes), sont plus rares et ont des crêtes moins nombreuses.

C. Composition

La composition des différentes parties de la mitochondrie, dont la connaissance est indispensable si l'on désire comprendre le rôle de cet organite, doit être étudiée à partir de fractions.

a. Méthode d'étude

Des fractions mitochondriales peuvent être obtenues de la manière suivante.

Des organites isolés sont placés dans un milieu enrichi en saccharose *(fig. VIII-7)*. Celui-ci traverse aisément la membrane externe et le compartiment intermembranaire est rapidement à la même concentration que le milieu extérieur; il ne pénètre pas par contre dans la matrice, la membrane interne étant imperméable à ce glucide; en conséquence il existe un flux d'eau important de la matrice vers le milieu externe. Le volume de l'espace intermembranaire est ainsi considérablement augmenté et il est possible de briser mécaniquement (par des ultrasons) la membrane externe. Des centrifugations fractionnées permettent alors de séparer la membrane externe, l'ensemble membrane interne + matrice (constituant ce que l'on nomme un mitoplaste) et le contenu du compartiment intermembranaire, dilué dans le surnageant.

À partir du culot de mitoplastes, il est possible par un choc osmotique de briser la membrane interne; le contenu de la matrice est libéré et il est possible de séparer les constituants (membrane interne et structures matricielles) par des séries de centrifugations.

b. La membrane externe et l'espace intermembranaire

La composition de la membrane externe est très voisine, en données pondérales, de celle de la membrane plasmique: 60 % de protéines et 40 % de lipides polaires.

Ce qui la caractérise est la présence de très nombreux pores constitués à partir des protéines intégrées: la membrane externe est en effet *très perméable* aux molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 10000 daltons. En conséquence, la composition de l'espace intermembranaire est très voisine de celle du cytosol.

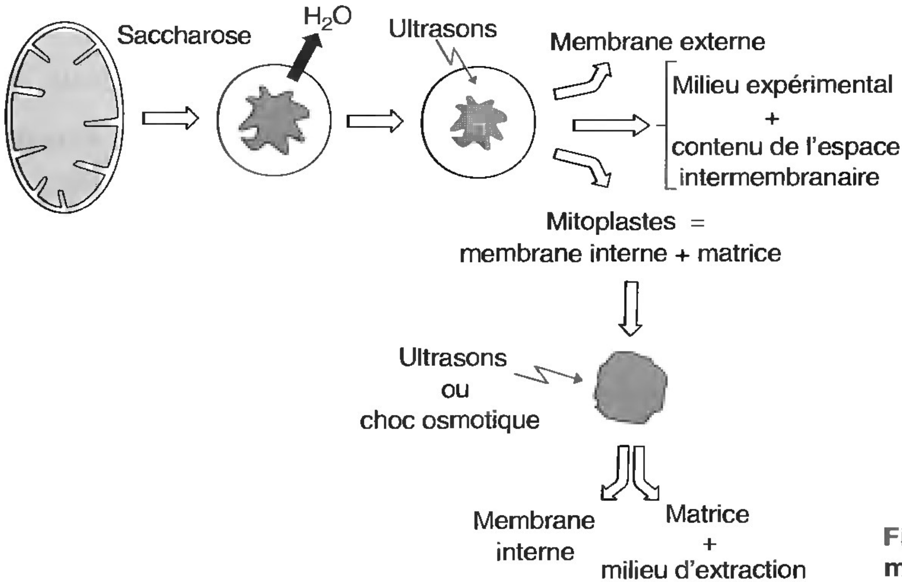


Fig. VIII-7: Obtention de fractions mitochondriales.

c. La membrane interne

Sa composition, très différente, est inhabituelle ; elle comporte en effet 80 % de protéines, seulement 20 % de lipides et parmi ceux-ci il n'y a pas de cholestérol.

Ce qui la caractérise essentiellement est son imperméabilité ; seules quelques petites molécules non chargées (CO_2, H_2O) peuvent la traverser librement ; le passage de toutes les autres substances doit faire appel à des ***transporteurs*** ; ils assurent des transferts couplés (symport ou antiport) souvent liés à l'existence d'un gradient électrochimique de protons *(fig. VIII-8)*.

Ces transporteurs sont en partie responsables de la forte teneur en protéines relevée dans cette membrane interne ; ils n'en sont pas les seuls. Cette membrane contient en effet deux autres types de constituants : ceux de ***la chaîne respiratoire*** et ***les ATP-synthases***.

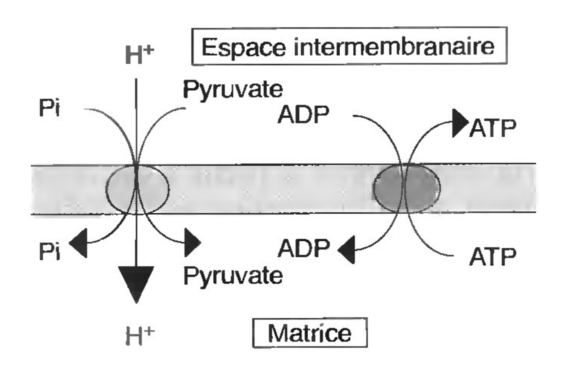


Fig. VIII-8 : Transports couplés (symport et antiport) au niveau de la membrane interne.

- **Les constituants de la chaîne respiratoire**

Il convient d'en distinguer deux types différents.

– ***Les transporteurs d'électrons et de protons***

Ce sont donc des transporteurs d'hydrogène intégrés à la membrane interne.

Le premier est *la NADH-déshydrogénase* qui réalise la réaction d'oxydo-réduction suivante :

$$NADH + H^{+} + \text{NADH déshydrogénase oxydée} \rightarrow NAD^{+} + \text{NAD déshydrogénase réduite}$$

Le coenzyme de cette déshydrogénase est la flavine mononucléotide ou ***FMN*** *(fig. VIII-9)*, dont le groupement actif est la flavine, molécule capable de fixer deux électrons et deux protons (flèches) ; l'apoenzyme protéique reconnaît le NADH.

On peut donc écrire plus simplement :

$$NADH + H^{+} + FMN \rightarrow NAD^{+} + FMNH_2$$

Ce premier constituant de la chaîne respiratoire assure la régénération du NAD^{+}.

Le second est l'***ubiquinone*** dont le coenzyme est le coenzyme Q qui intervient de la même manière dans les réactions d'oxydo-réduction en fixant deux électrons et deux protons *(fig. VIII-10)*.

– ***Les transporteurs d'électrons seuls***

On en connaît deux types dans la membrane interne de la mitochondrie.

Les ***cytochromes*** sont des hétéroprotéines dont le groupement prosthétique est l'hème

$2\,H^{+}\ 2\,e^{-}$

Fig. VIII-9 : Flavine mononucléotide (FMN).

Fig. VIII-10 : Fixation de $2H^+$ et $2e^-$ par le noyau quinone.

(fig. VIII-11). Dans celui-ci, l'atome de fer passe aisément, et de manière réversible, de l'état ferreux à l'état ferrique :

$$\underset{\text{Forme réduite}}{Fe^{2+}} \rightarrow \underset{\text{Forme oxydée}}{Fe^{3+} + e^-}$$

Il existe dans la membrane interne plusieurs cytochromes différents, b, c, c_1, et le complexe a + a_3 plus connu sous le nom de cytochrome oxydase car il transfère directement ses électrons à l'oxygène.

Les ***protéines fer-soufre*** sont des protéines auxquelles sont liés 2 ou 4 atomes de fer par l'intermédiaire d'atomes de soufre des cystéines *(fig. VIII-12)*.

- **Les ATP-synthases**

Ce sont des enzymes qui catalysent la réaction :

$$ADP + Pi \rightarrow ATP$$

Elles correspondent aux particules pédonculées observées sur la face matricielle de la membrane interne. On y reconnaît deux parties : le pédoncule (F_0) formé par des polypeptides hydrophobes est inséré dans la membrane interne ; la partie globulaire hydrophile (F_1) fait saillie dans la matrice *(fig. VIII-13)*.

d. La matrice

Sa composition est très complexe. On y trouve de très nombreux métabolites, des enzymes intervenant dans la dégradation des substrats, notamment de l'acide pyruvique (déshydrogénases, décarboxylases, isomérases...), de l'ADN et des ribosomes.

L'ADN mitochondrial *(fig. VIII-14)* est de petite taille (16500 pb chez les mammifères), circulaire ; associé à des protéines basiques il est organisé d'une manière comparable au nucléoïde bactérien. Sa composition en bases est différente de celle de l'ADN contenu dans le noyau de la cellule où se trouvent les mitochondries : *les deux molécules ne peuvent pas s'hybrider.*

Les ribosomes mitochondriaux sont différents des ribosomes de la cellule : ils sont plus petits et sont formés à partir d'ARN dont le coefficient de sédimentation est le même que celui des ARNr procaryotes.

La présence d'ADN et de ribosomes permet la synthèse de protéines dans la mitochondrie elle-même. On peut mettre cette synthèse en

Fig. VIII-11 : Cytochrome.
Les cytochromes sont des hétéroprotéines dont le groupement prosthétique est l'hème ; dans celui-ci, le fer peut passer réversiblement de l'état réduit à l'état oxydé. Les différents cytochromes se distinguent par certains groupements de l'hème et par leur partie protéique. Dans le cytochrome c, représenté ici, l'hème est lié à la protéine par l'intermédiaire de deux cystéines (radicaux représentés en rouge et encadrés).

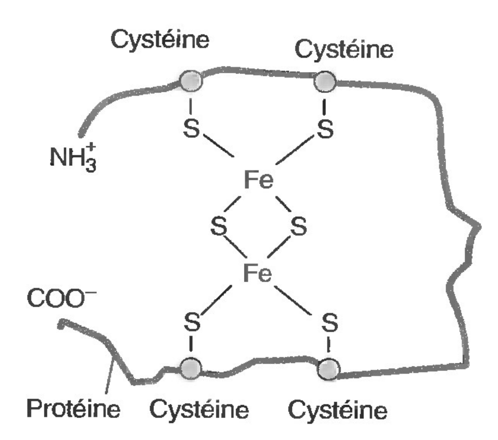


Fig. VIII-12 : Représentation schématique d'une protéine fer-soufre.

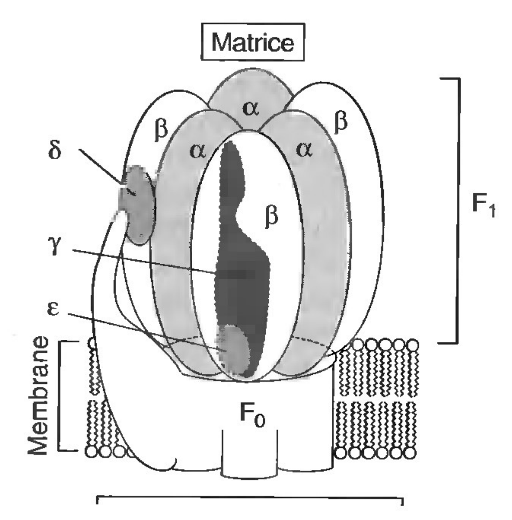


Fig. VIII-13 : ATP-synthases.
Elles correspondent aux sphères pédonculées observées sur la face matricielle de la membrane interne de la mitochondrie. Elles sont constituées d'une partie hydrophobe, F_0, intégrée dans la membrane, qui est un canal à protons, et d'une partie globulaire, F_1, qui est l'unité catalytique.

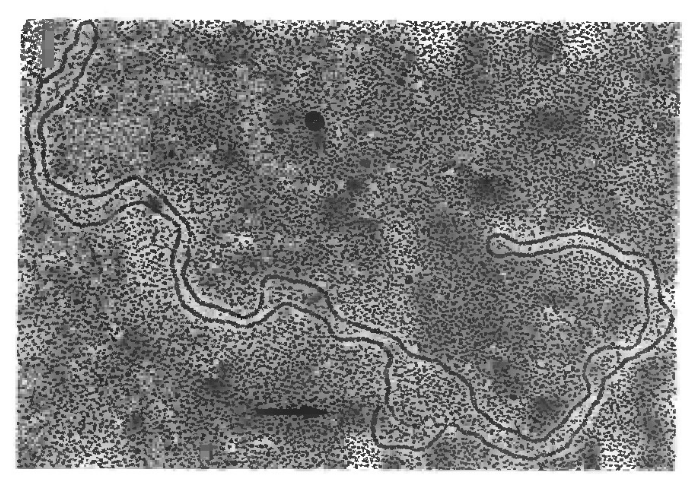


Fig. VIII-14 : ADN mitochondrial de grenouille.
La molécule d'ADN mitochondrial isolée est observée en microscopie électronique après étalement et ombrage rotatif. Notez la présence d'un œil de réplication (flèche).
G. x 54 000.
(Reproduit de M. MONNEROT, J.C. MOUNOLOU, M. SOLIGNAC. Intra-individual length heterogeneity of Rana esculenta *mitochondrial DNA. Bio Cell 1984; 52: 213-218.)*

évidence à l'aide d'éléments marqués (uridine tritiée et acides aminés) et démontrer qu'il existe une transcription et une traduction intramitochondriales. On a d'ailleurs isolé, à partir de ces organites, des ARN polymérases, des ARNm et ARNt ; *ils sont de type bactérien* et peuvent fonctionner dans un système acellulaire procaryote.

Le code génétique employé pour ces synthèses est, dans les mitochondries des animaux, différent de celui utilisé dans les synthèses cytosoliques ou dans les mitochondries végétales ; 4 codons sur les 64 possibles ont en effet une signification différente ; ainsi UGA qui est le codon stop dans le code général (et pour les mitochondries végétales) correspond au tryptophane dans les mitochondries de mammifères et de drosophile ; AGA qui signifie habituellement arginine est le codon stop mitochondrial des mammifères et indique la sérine dans les organites de la drosophile.

Cet ADN mitochondrial peut aussi se dupliquer ; on a isolé les systèmes enzymatiques réalisant la réplication, dont les ADN polymérases qui sont également de type procaryote ; on peut y observer des yeux de réplication *(fig. VIII-14)*.

Le nombre de protéines contenues dans la mitochondrie est cependant bien supérieur à ce que peut coder l'ADN mitochondrial ; un certain nombre de ces protéines est donc édifié à partir d'une information située dans le noyau de la cellule.

On peut très aisément mettre en évidence cette double origine en utilisant des inhibiteurs spécifiques des protéosynthèses :

– le chloramphénicol est un antibiotique qui bloque celles de type bactérien (p. 244), donc celles de la mitochondrie ; en fournissant simultanément cet antibiotique et des aminoacides marqués, on peut identifier les protéines

mitochondriales élaborées uniquement à partir d'une information d'origine nucléaire ;

– la cycloheximide inhibe celles de type cytosolique chez les Eucaryotes (p. 244) ; l'emploi d'acides aminés radioactifs permet alors l'identification des polypeptides entièrement construits à partir de l'information contenue dans la mitochondrie.

On met ainsi en évidence une *étroite collaboration des deux génomes* : le mitochondrial et le nucléaire. La plupart des complexes enzymatiques, dont les ATP-synthases, sont formés par la juxtaposition de polypeptides synthétisés à partir de ces deux types d'information ; la *figure VIII-15, B* montre bien toute l'importance de cette coopération.

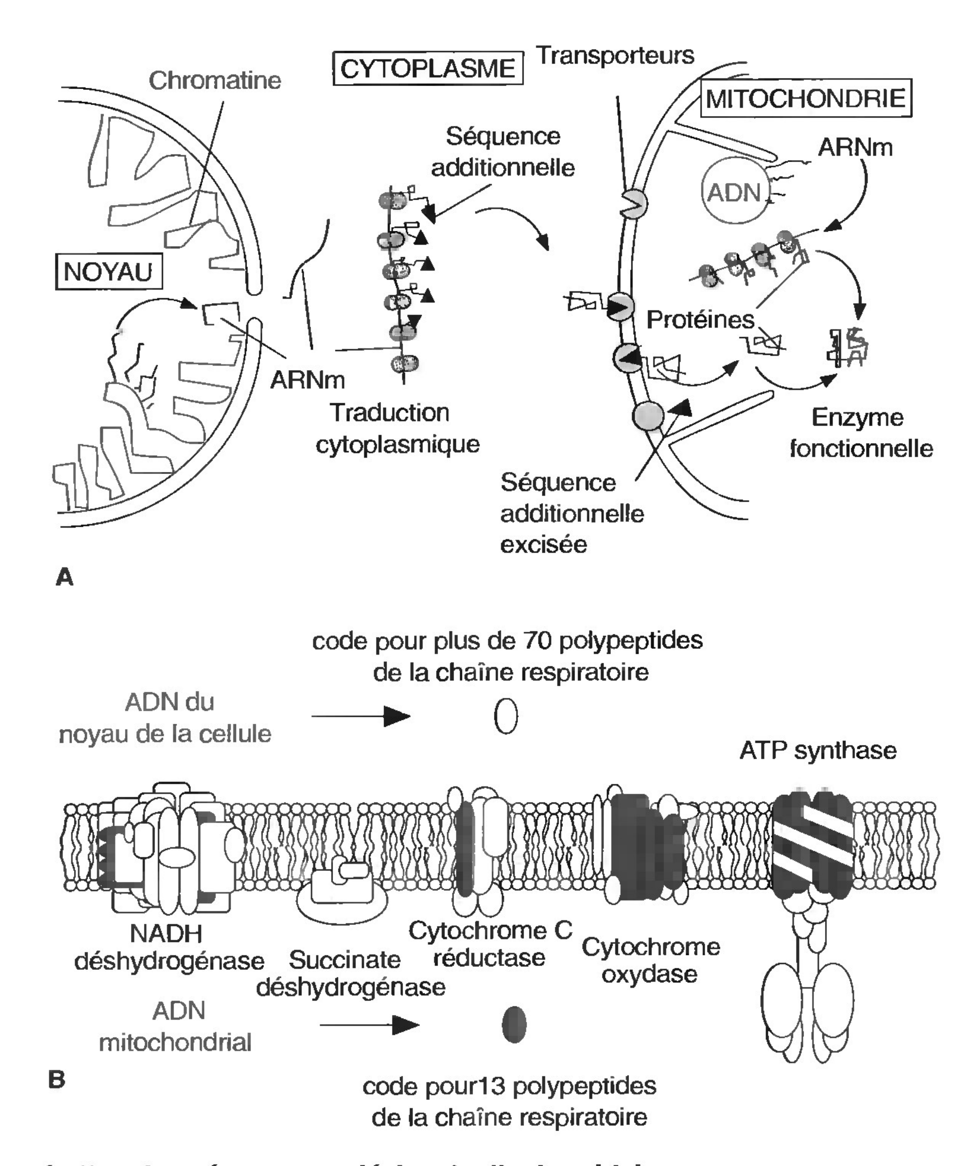


Fig. VIII-15 : Coopération des génomes nucléaire et mitochondrial.
A) L'ARNm transcrit dans le noyau de la cellule est traduit par les ribosomes cytoplasmiques. Le polypeptide produit possède une séquence d'adressage qui permet son identification par des récepteurs de l'enveloppe mitochondriale ; cette séquence est excisée après la pénétration dans la matrice. Ce polypeptide est ensuite associé à d'autres polypeptides, certains élaborés dans la matrice, par les mitoribosomes, à partir de l'information codée par le nucléoïde. (Les dimensions des organites n'ont pas été respectées pour la clarté du schéma.)
B) Représentation schématique de la membrane mitochondriale interne ; le figuré différent des polypeptides codés par le noyau de la cellule (en blanc) et de ceux dont l'information est portée par le nucléoïde (en rouge) montre bien l'intimité de la collaboration des deux génomes.
(B, d'après P. RUSTIN, A. MUNNICH et A. RÖTIG. Dix ans d'exploration des maladies mitochondriales : une collaboration modèle entre les chercheurs et les cliniciens. Médecine/Science 1996 ; n° spécial : 37-43.)

Les protéines synthétisées à partir de l'information nucléaire sont construites dans le cytosol à l'aide des ribosomes de la cellule. Le polypeptide est élaboré avec une séquence supplémentaire, *la séquence d'adressage* (MTS, p. 245), constituée par 15 à 30 acides aminés situés à l'extrémité N-terminale, qui permet son identification par des transporteurs membranaires mitochondriaux *(fig. VIII-15, A)*. La molécule est synthétisée en totalité avant de pénétrer dans la mitochondrie ; le système est donc fort différent de celui mis en œuvre pour assurer la pénétration des polypeptides dans le réticulum endoplasmique (voir p. 298).

La pénétration dans la mitochondrie est assurée par deux systèmes de translocation indépendants : l'un est situé dans la membrane externe, c'est le système **TOM** *(Translocase of the Outer mitochondrial Membrane)*, l'autre dans la membrane interne, c'est le système **TIM** *(Translocase of the Inner mitochondrial Membrane)*. Ces systèmes sont composés de plusieurs polypeptides, certains transmembranaires. Ils peuvent fonctionner de concert, lorsque les deux membranes sont suffisamment rapprochées, permettant alors le transfert d'une protéine du cytosol vers la matrice mitochondriale ; ils peuvent aussi être indépendants et assurer le passage d'un polypeptide dans l'espace intermembranaire.

Le mécanisme du transfert lui-même commence à être bien compris *(fig. VIII-16)*. Les précurseurs des protéines à transférer, avec leur séquence d'adressage, s'associent à des protéines chaperons qui les maintiennent plus ou moins déroulés, ou tout au moins dans une structure tridimensionnelle compatible avec le passage de canaux transmembranaires.

Il semble exister deux voies pour guider les précurseurs aux récepteurs et par conséquent deux sortes de chaperons : une HSP 70 et le **MSF** *(Mitochondrial import Stimulation Factor)*, ce dernier étant vraisemblablement plus consommateur d'ATP que le premier.

Ces protéines chaperons guident les précurseurs protéiques vers les récepteurs de la membrane externe auxquels elles les associent ; le chaperon est libéré et le précurseur introduit dans le canal protéique TOM.

Le passage entre les translocases TOM et TIM est d'abord favorisé par le potentiel électrochimique Ψ ; il est ensuite achevé par un chaperon mitochondrial, une HSP 70-ATP dépendant ; le transport est donc consommateur d'énergie.

Dans la matrice, la séquence d'adressage est éliminée, la protéine acquiert sa structure tridimensionnelle ; elle devient fonctionnelle.

Ce transport de protéine est important surtout dans le sens cytoplasme → matrice, mais il semble établi maintenant qu'un transport en sens inverse existe également.

Il s'ensuit que les mitochondries ne peuvent pas subsister en dehors de l'environnement cellulaire ; elles dépendent très étroitement de l'information nucléaire. Ce ne sont pas des organites autonomes ; on dit qu'ils sont *semi-autonomes*.

L'existence d'un génome mitochondrial a une autre conséquence : ***il n'y a pas de néoformation de mitochondries ; elles proviennent toujours de la division de mitochondries préexistantes.***

D. Les oxydations respiratoires

L'approvisionnement énergétique de la cellule provient essentiellement de la dégradation de deux types de molécules : les glucides, dont nous avons vu qu'ils étaient transformés au cours de la glycolyse en *acide pyruvique* avec formation d'ATP et de $NADH + H^+$, et les lipides, principalement les *triglycérides*, qui sont décomposés, *dans le cytosol*, en glycérol et en acide gras. Ce sont ces molécules qui vont pénétrer dans la mitochondrie et y être dégradées.

a. Pénétration dans la mitochondrie

Le glycérol est transformé dans le cytosol en dihydroxyacétone phosphate :

$$\begin{array}{lll} CH_2OH & CH_2OH & CH_2OH \\ | & | & | \\ CHOH + ATP \rightarrow & CHOH + NAD^+ \rightarrow & C=O + NADH + H^+ + ADP \\ | & | & | \\ CH_2OH & CH_2{-}O{-}P & CH_2{-}O{-}P \end{array}$$

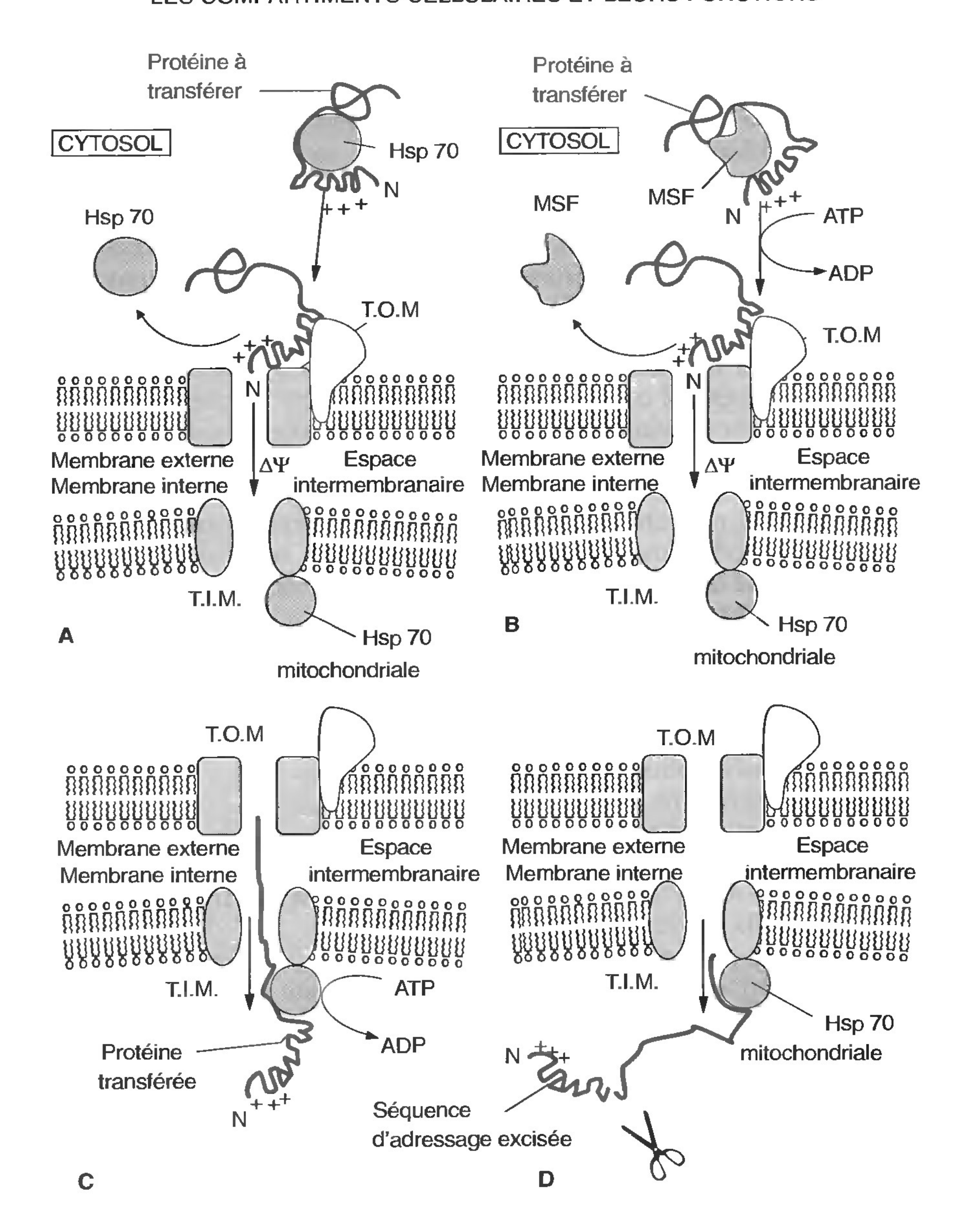


Fig. VIII-16 : Transfert de protéines du cytosol vers la matrice mitochondriale.

A et B) Ce sont des protéines chaperons qui reconnaissent les précurseurs des protéines à transférer dans la mitochondrie par leur séquence d'adressage ; elles les maintiennent dans une conformation compatible avec la traversée d'un pore membranaire. Deux systèmes coexistent : celui mettant en œuvre une HSP 70 cytosolique (A) et celui (B) faisant appel au MSF *(Mitochondrial import Stimulation Factor)*, ce dernier étant consommateur d'ATP. Ces deux chaperons permettent la reconnaissance du système de translocation de la membrane externe, TOM *(Translocase of the Outer mitochondrial Membrane)*, auquel ils associent les précurseurs protéiques ; dans un premier temps, ces molécules sont entraînées vers l'espace intermembranaire par le potentiel électrochimique (ΔΨ).
C) Les précurseurs protéiques sont ensuite transférés dans la matrice par l'intermédiaire du système de translocation de la membrane interne, TIM *(Translocase of the Inner mitochondrial Membrane)* auquel est associée une protéine chaperon mitochondriale, une HSP 70 ATP-dépendante.
D) Dès sa pénétration dans la matrice, la séquence d'adressage est excisée.
(D'après V. HAUCKE et G. SCHATZ. Import of proteins into mitochondria and chloroplasts. Trends in Cell Biology 1997 ; 7 : 103-107.)

Le dihydroxyacétone phosphate ainsi produit est isomérisé en phosphoglycéraldéhyde et entre dans la voie de la glycolyse.

Le pyruvate et les acides gras sont transférés dans la mitochondrie par des transporteurs spécifiques *(fig. VIII-18, A)*.

Le NADH ne pénètre pas dans la mitochondrie. C'est un système de navettes transmembranaires qui réalise le passage des électrons et des protons dans la matrice mitochondriale *(fig. VIII-18, A)*. La navette malate-aspartate assure la transmission intégrale du pouvoir réducteur puisque c'est un NAD^+ qui est réduit dans la matrice ; aspartate et malate sont transférés par des transporteurs spécifiques *(fig. VIII-18, B)*. La navette est bidirectionnelle : elle permet aussi bien le transfert du pouvoir réducteur produit par glycolyse dans le cytosol vers la matrice mitochondriale que l'exportation du pouvoir réducteur obtenu au cours du cycle de Krebs, vers le cytoplasme où il est utilisé pour réaliser certaines synthèses. La navette glycérol-phosphate *(fig. VIII-18, C)* assure le transfert du pouvoir réducteur du NADH cytoplasmique au FAD matriciel. Ce coenzyme de déshydrogénase, *la flavine adénine dinucléotide*, le **FAD** *(fig. VIII-17)*, est le coenzyme d'un catalyseur important du cycle de Krebs (voir pages 336 et 337) qui est lié à la membrane interne de la mitochondrie, *la succino-déshydrogénase (fig. VIII-23)*. Le noyau actif est, dans ce coenzyme comme dans celui de la NAD-déshydrogénase *(fig. VIII-9)*, la flavine, qui peut accepter deux protons et deux électrons. Ces deux modes de transfert d'électrons et de protons ne sont pas rigoureusement équivalents puisque, comme nous le verrons plus loin, le bilan de la glycolyse n'est pas le même si l'une ou l'autre de ces navettes est utilisée.

Ces molécules ayant pénétré dans la matrice mitochondriale vont y subir une série complexe de transformations.

b. La formation de l'acétyl-coenzyme A

Le pyruvate est déshydrogéné et décarboxylé par un complexe multienzymatique volumineux, la *pyruvate déshydrogénase*, ce qui permet la formation de NAD réduit, et d'un groupement acétyle (CH_3–COO^-) qui est transféré sur un transporteur particulier, le **coenzyme A** (CoA).

Fig. VIII-17 : Flavine adénine dinucléotide (FAD), forme oxydée et forme réduite.

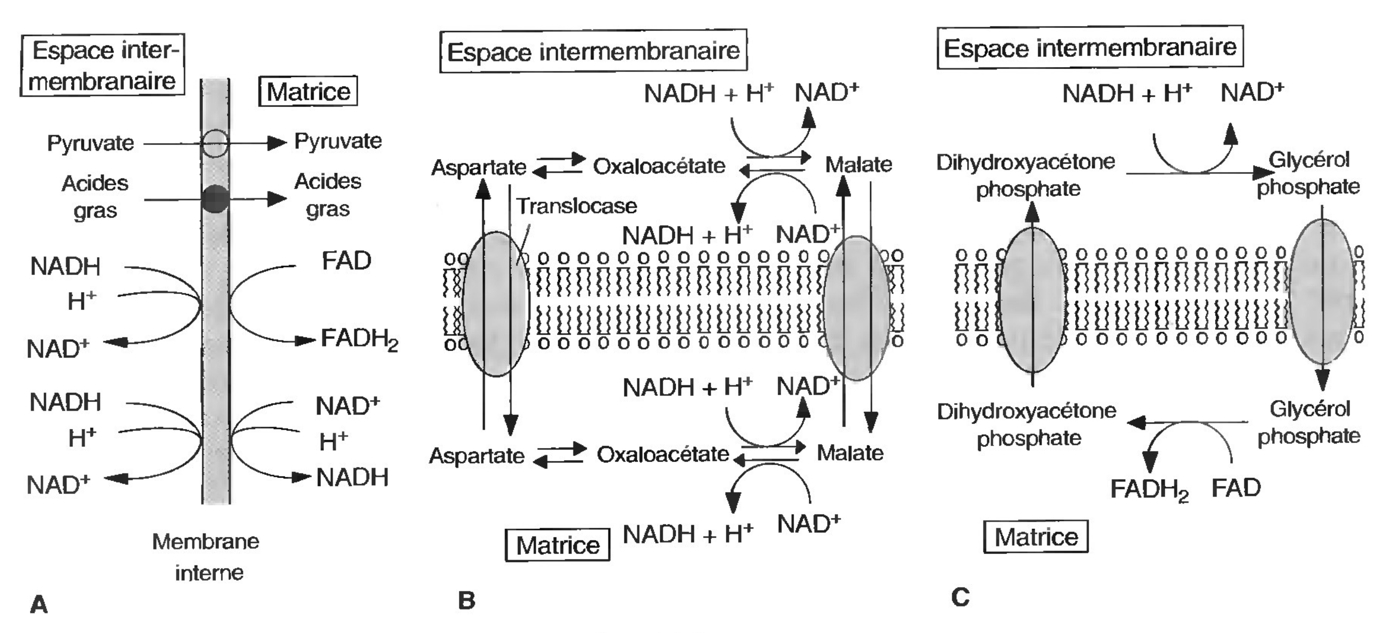


Fig. VIII-18 : Pénétration dans la matrice mitochondriale.

A) Le pyruvate et les acides gras sont transportés dans la matrice mitochondriale par des transporteurs spécifiques ; le NADH ne pénètre pas dans la mitochondrie mais des systèmes navettes permettent le transfert du pouvoir réducteur soit sur une flavine adénine dinucléotide (FAD), soit sur un NAD^+ dans la matrice.

B) La navette malate-aspartate permet le transfert intégral du pouvoir réducteur puisque c'est un NAD^+ qui est réduit dans la matrice ; aspartate et malate sont transférés par des transporteurs spécifiques. La navette est bidirectionnelle : elle permet aussi bien le transfert du pouvoir réducteur produit par glycolyse vers la matrice mitochondriale que l'exportation de ce pouvoir réducteur vers le cytoplasme.

C) La navette glycérol-phosphate assure le transfert du pouvoir réducteur du NADH cytoplasmique au FAD matriciel.

Ce coenzyme A est un transporteur de groupements acétyl dont le groupement actif est un sulfhydrile, SH. On a donc globalement :

$$CH_3\text{–CO–COOH} + NAD^+ + HSCoA \rightarrow$$
$$CH_3\text{–CO–SCoA} + NADH + H^+ + CO_2$$

Il y a donc réduction d'un NAD^+, dégagement d'une molécule de dioxyde de carbone et production d'un acétyl, ***molécule à deux atomes de carbone***.

Les acides gras sont décomposés de manière séquentielle par des complexes enzymatiques qui décrochent deux atomes de carbone en produisant une molécule d'acétyl-CoA et des coenzymes de déshydrogénases réduits ($FADH_2$ et NADH). Ces enzymes dégradant progressivement les très longues molécules d'acide gras en coupant toujours au niveau du second carbone (carbone β, voir chapitre sur les lipides), on parle de *β-oxydation (fig. VIII-19)*.

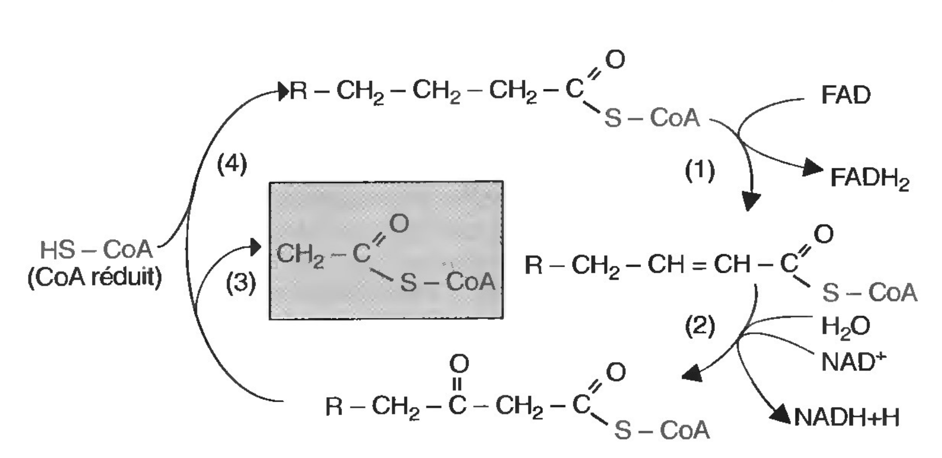


Fig. VIII-19 : Dégradation des acides gras, la β-oxydation.

Les deux composés entrés dans la mitochondrie, acides gras et pyruvate, ont donc, au cours de cette première étape, été transformés en acétyl-CoA.

c. *L'oxydation de l'acétyl-coenzyme A : le cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs*

L'acétyl-coenzyme A est décarboxylé et déshydrogéné au cours d'un cycle de 8 réactions chimiques *(fig. VIII-20)* qui constituent le cycle des acides tricarboxyliques, ou cycle de Krebs du nom du biochimiste qui le mit en évidence.

La première réaction est la synthèse d'un acide à ***six carbones***, l'acide citrique, à partir d'un acide à 4 carbones, l'acide oxaloacétique, et de l'acétyl-CoA. Le coenzyme A est libéré.

L'acide citrique est isomérisé en acide isocitrique (à six carbones) qui est alors décarboxylé et oxydé, ce qui conduit à la formation d'un acide à 5 carbones l'acide α-cétoglutarique : une molécule de dioxyde de carbone se dégage et un NAD^+ est réduit.

Cet acide α-cétoglutarique est lui-même décarboxylé et oxydé ; fixant une molécule de coenzyme A, il donne naissance au succinyl-CoA, *molécule à 4 carbones* ; un CO_2 est dégagé, et un NAD^+ est réduit.

Le succinyl-CoA libère le coenzyme A ce qui permet la synthèse d'un nucléoside triphosphate, le GTP ; celui-ci est utilisé pour reformer un ATP à partir d'ADP ; une molécule d'acide succinique est ainsi produite.

Fig. VIII-20 : Cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de Krebs.

L'acide succinique est immédiatement oxydé en acide fumarique par une enzyme associée à la membrane interne, la succino-déshydrogénase, dont le coenzyme est la flavine adénine dinucléotide, le FAD *(fig. VIII-17)*.

Par fixation d'une molécule d'eau, cet acide fumarique est transformé en acide malique qui est lui-même oxydé en acide oxaloacétique par une déshydrogénase à NAD.

L'oxaloacétate est régénéré; la totalité du groupement acétyl a été oxydée. Un nouveau tour du cycle peut commencer.

Au cours de ce cycle, un seul ATP a été formé; deux molécules de dioxyde de carbone ont été dégagées; trois NAD^+ et un FAD ont été réduits.

Il y a donc très peu d'ATP produit; l'essentiel de l'énergie de la molécule oxydée se trouve en effet stocké ***sous forme d'électrons à haute énergie dans les coenzymes de déshydrogénases***. C'est cette énergie qui va être récupérée par phosphorylation oxydative.

d. Les transferts d'électrons et la phosphorylation oxydative

Les coenzymes réduits sont des réducteurs, c'est-à-dire qu'ils sont susceptibles de donner leurs électrons à un substrat qui va ainsi passer de l'état oxydé à l'état réduit.

Prenons le cas du NAD^+ qui peut fixer deux hydrogènes (2 électrons et 2 protons) et passer ainsi de la forme oxydée à la forme réduite :

$$NAD^+ + 2H \rightarrow NADH + H^+$$

Ce NAD réduit peut alors s'oxyder en cédant électrons et protons à un autre transporteur (ici la flavine mononucléotide) qui passera, lui, de la forme oxydée à la forme réduite.

$$NADH + H^+ + FMN \rightarrow NAD^+ + FMNH_2$$

On écrit de préférence ce transfert sous la forme représentée sur la *figure VIII-21*, afin de bien marquer l'amorce d'une *chaîne d'oxydo-réduction*.

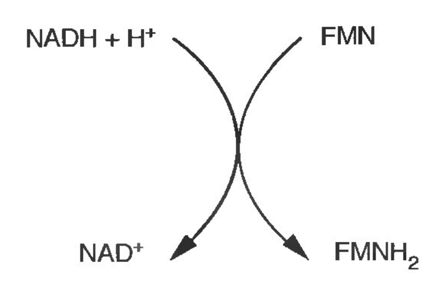


Fig. VIII-21 : Oxydo-réduction.

- **La chaîne de transporteurs**

Ces transferts d'électrons ne s'effectuent pas dans n'importe quel sens ; la molécule acceptrice (le FMN ici) doit posséder une plus grande affinité pour les électrons que la molécule donneuse (le NAD), c'est-à-dire que *le potentiel d'oxydo-réduction du composé accepteur doit être supérieur à celui du composé donneur.*

Nous avons vu qu'il y avait plusieurs transporteurs d'électrons dans la membrane interne, le problème à résoudre est donc de déterminer l'ordre dans lequel vont s'effectuer les transferts d'électrons.

On peut y arriver de deux manières différentes :

– en déterminant les potentiels d'oxydo-réduction des différents transporteurs et en respectant la hiérarchie des transferts que nous venons de définir ;

– en utilisant des inhibiteurs qui bloquent le transfert entre deux transporteurs ; en amont de ce blocage, tous les transporteurs seront sous forme réduite, en aval ils seront tous sous forme oxydée. Par exemple la roténone bloque le FMN sous forme réduite ; on constate alors que le NAD est comme le FMN sous forme réduite, alors que les protéines fer-soufre, les quinones, les cytochromes sont sous forme oxydée ; dans la chaîne des transporteurs, ces derniers sont donc situés après le FMN. Autre exemple, le cyanure interdit le transfert des électrons sur la cytochrome oxydase (cytochrome a + a_3) ; on constate alors que seul ce transporteur est sous forme oxydée, tous les autres sont sous forme réduite ; la cytochrome oxydase est en conséquence le dernier transporteur d'électrons.

La mise en œuvre conjointe de ces deux méthodes permet ainsi d'établir la chaîne des transporteurs dans la membrane interne de la mitochondrie *(fig. VIII-22)*.

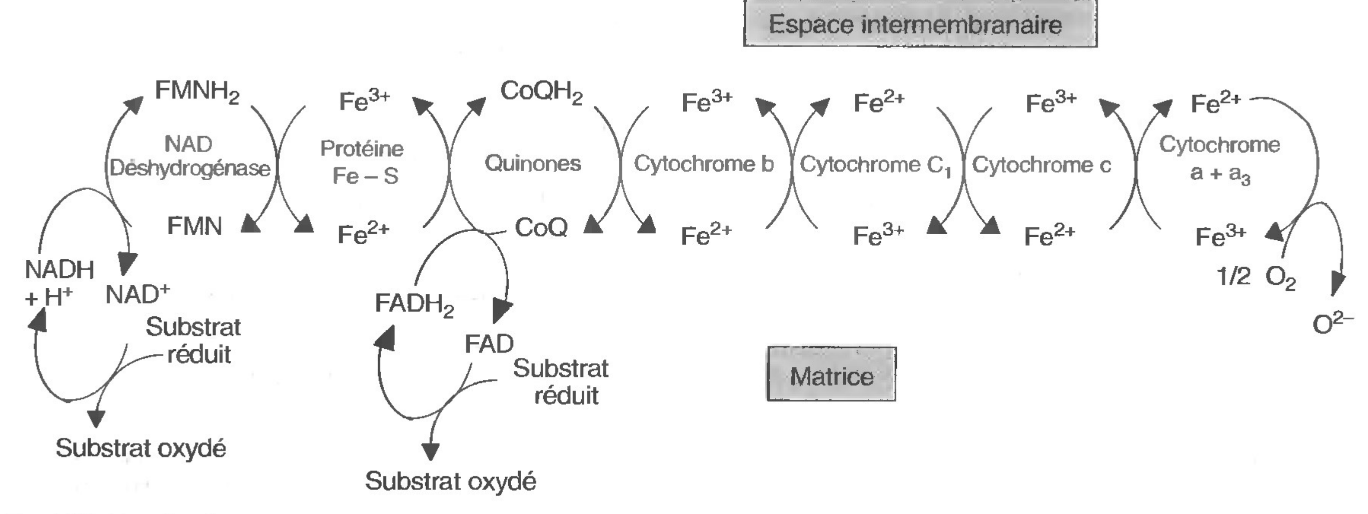


Fig. VIII-22 : Chaîne des transporteurs dans la membrane interne.

Le NADH, qui constitue *un pool soluble dans la matrice*, transmet ses électrons au premier transporteur de la chaîne, la NADH-déshydrogénase.

Le $FADH_2$ qui fait partie du complexe de la succino-déshydrogénase liée à la membrane interne cède ses électrons aux quinones.

- **Les complexes macromoléculaires intramembranaire et la formation d'un gradient de protons**

Les transferts d'électrons ne sont possibles que si les différents transporteurs impliqués sont suffisamment proches les uns des autres, quelques Angströms, voire quelques dizaines d'Angströms.

On a constaté que, dans la membrane, ces distances adéquates étaient maintenues, en ce qui concerne certains transporteurs tout au moins, par une ***étroite association avec des protéines***. Dans les volumineux complexes ainsi constitués, *intégrés à la membrane interne*, les molécules réactives sont maintenues à des distances suffisamment proches pour que les transferts d'électrons puissent avoir lieu.

En utilisant des détergents ioniques doux, comme le désoxycholate, on a pu isoler quatre complexes macromoléculaires :

Le complexe NAD-déshydrogénase-CoQ réductase, ou Complexe I, de 800 000 daltons, comporte 22 polypeptides ; les transporteurs qu'il contient sont la NAD déshydrogénase et son coenzyme la FMN, et des protéines fer-soufre.

Le complexe succinate-déshydrogénase-CoQ réductase, ou Complexe II de 97 000 daltons qui oxyde le succinate en fumarate (enzyme du cycle de Krebs) et réduit le CoQ en $CoQH_2$.

Le complexe b + c_1, cytochrome c-réductase ou Complexe III, de 500 000 daltons, dans lequel ces transporteurs sont associés à 8 polypeptides et à des protéines fer-soufre.

Le complexe cytochrome-oxydase, ou Complexe IV de 300 000 daltons formé par 8 polypeptides et les deux cytochromes a et a_3.

Ces complexes intégrés sont relativement mobiles dans la membrane, mais ce sont les deux transporteurs de petite taille, non associés à ces gros ensembles macromoléculaires, qui assurent, entre eux, le transport des électrons.

L'ubiquinone, liposoluble, assure le transport entre le complexe NAD-déshydrogénase et le complexe b-c_1, dans l'épaisseur de la membrane interne.

Le cytochrome c transfère les électrons entre le complexe b-c_1 et le complexe cytochrome oxydase en passant par l'espace intermembranaire.

Ce qu'il faut souligner, c'est que dans cette chaîne de transporteurs, il y a une certaine *alternance entre les transporteurs d'électrons*

seuls et les transporteurs d'hydrogène, ce qui a des conséquences importantes.

Considérons le premier transfert : FMN (transporteur d'hydrogène) → protéines fer-soufre (transporteurs d'électrons seuls), le passage de l'un à l'autre va donc s'accompagner de la perte de protons H^+.

Mais si nous envisageons le second : protéines fer-soufre (transporteurs d'électrons) → ubiquinone (transporteur d'hydrogène), le passage d'électrons va nécessiter le prélèvement de protons dans le milieu.

*Or, ces transporteurs sont disposés de manière telle dans les complexes intramembranaires que le transfert des électrons va s'accompagner d'**un transfert vectoriel** des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire (fig. VIII-23).*

Au niveau du complexe I, NAD-déshydrogénase, deux protons sont libérés dans la matrice par électron transporté. Deux autres H^+ sont transférés par le CoQ et un autre par le complexe IV, cytochrome c-oxydase (toutefois par un mécanisme différent des précédents). Au total, 5 H^+ passent ainsi de la matrice dans l'espace intermembranaire lorsqu'un électron est transporté (soit 10 H^+ par paire d'électrons).

Lorsque la voie utilisée est celle du complexe II, trois protons seulement sont transférés pour un seul électron (soit 6 par paire d'électrons).

Quant aux électrons, ils sont transférés directement sur l'oxygène ; l'oxygène est donc *l'accepteur final.*

- **La phosphorylation oxydative**

La membrane interne étant imperméable aux ions, les protons ne peuvent pas regagner la matrice par simple diffusion. La concentration en ions H^+ augmente ainsi rapidement dans le compartiment intermembranaire : *celui-ci acquiert une charge positive et un pH acide.*

Il existe donc un double gradient, électrique et de pH, entre la matrice et l'espace intermembranaire, et *c'est au niveau des ATP-synthases que ces gradients sont réduits* ; cette réduction s'accompagne de la formation d'ATP. On peut le démontrer en incorporant, dans des vésicules membranaires artificielles, des liposomes, de la bactériorhodopsine, un pigment bactérien qui se comporte comme une pompe à protons lorsqu'il est éclairé, et des ATP-synthases mitochondriales ; à la lumière, de l'ATP est synthétisé *(fig. VIII-24).*

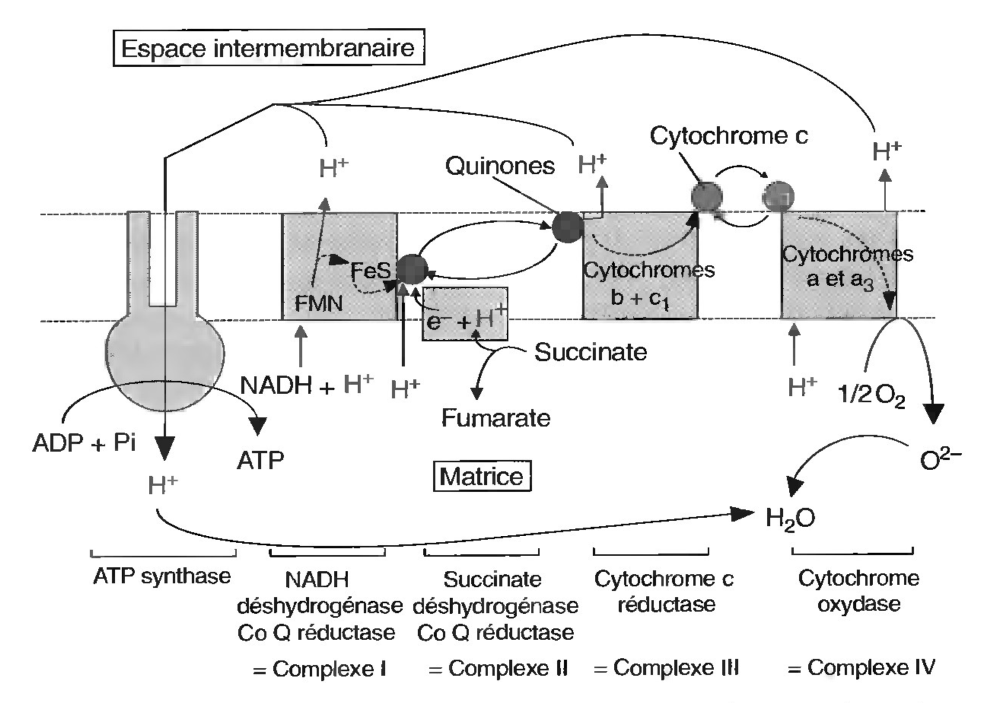


Fig. VIII-23 : Transport vectoriel des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

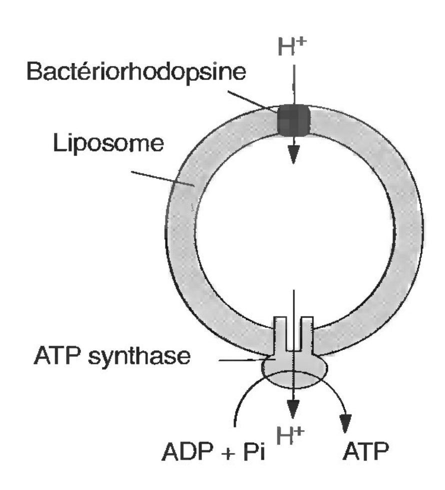


Fig. VIII-24 : Gradient de protons et synthèse d'ATP.
Des protons sont transférés dans des vésicules membranaires artificielles par éclairement d'une pompe bactérienne, la bactériorhodopsine ; les ATP-synthases incluses dans la membrane artificielle sont alors activées.

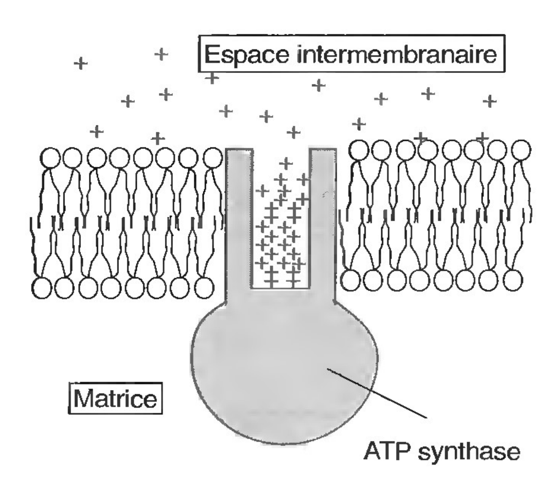
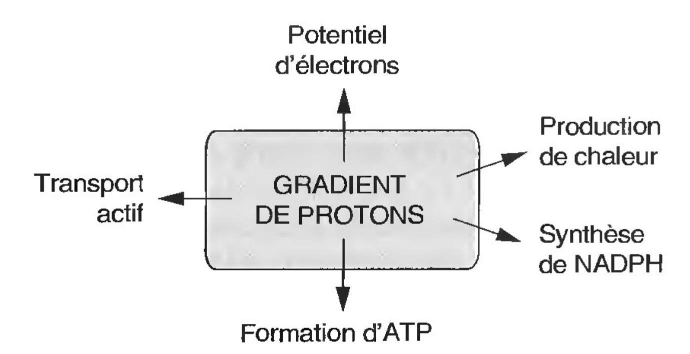


Fig. VIII-25 : Répartition des charges positives au niveau des ATP-synthases.

Les deux parties constituant les ATP-synthases peuvent être dissociées : la partie basale, CF_0, se comporte comme un simple canal : lorsqu'elle demeure seule, l'équilibre des charges se rétablit très rapidement. C'est donc CF_1 qui bloque le libre transfert des protons et qui constitue le complexe enzymatique susceptible de synthétiser l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Au fond du canal que constitue CF_0, la concentration en protons est plus importante qu'en n'importe quel autre point du compartiment intramembranaire. En effet, le transfert des électrons vers la matrice a chargé négativement celle-ci, les protons sont donc d'autant plus attirés vers elle que la distance séparant les deux compartiments est faible. *La partie catalytique CF_1 est donc située en un point où le gradient de pH est maximum (fig. VIII-25).*

Cette ***force protomotrice***, engendrée par le gradient de protons, est universellement reconnue comme étant la source de l'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP. Cette conception fut proposée par MITCHELL en 1961 dans sa ***théorie chimio-osmotique*** ; elle fut longtemps ignorée, voire critiquée. Elle a maintenant été vérifiée par de multiples expériences. Les protons qui ont, par cette voie, regagné la matrice peuvent réagir avec l'oxygène ayant reçu les électrons et former de l'eau.

Tous les protons transférés dans le compartiment intermembranaire ne sont pas cependant utilisés pour la synthèse d'ATP ; un certain nombre sont à l'origine du cotransport de molécules vers la matrice mitochondriale (voir p. 328) ; d'autres permettent la production de chaleur. Après le transfert du pouvoir réducteur en dehors de la mitochondrie, la mise en place de gradients de protons permet, entre autres, les transports actifs, la création d'un potentiel ou la synthèse d'un autre coenzyme qui est impliqué dans de nombreuses réactions, la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (le NADPH). Les gradients de protons sont donc des mécanismes clés jouant des rôles variés et importants dans la cellule.



E. Bilan

Lorsque des électrons sont cédés par le NADH à la NAD-déshydrogénase, le transfert d'une paire d'électrons le long de la chaîne respiratoire s'accompagne d'un transport vectoriel de 10 protons, ce qui permet la synthèse

Le transfert du NADH + H^+ cytoplasmique est réalisé par la navette malate-aspartate

	Du glycéraldéhyde à l'acide pyruvique	Formation de l'acétyl-CoA	Cycle de Krebs	Total
ATP	2		1	3
CO_2		1	2	3
NADH + H^+	1	1	3	5
$FADH_2$			1	1

Le transfert du NADH + H^+ cytoplasmique est réalisé par la navette glycérol-phosphate

	Du glycéraldéhyde à l'acide pyruvique	Formation de l'acétyl-CoA	Cycle de Krebs	Total
ATP	2		1	3
CO_2		1	2	3
NADH + H^+		1	3	4
$FADH_2$	1		1	2

de 3 molécules d'ATP à partir de 3 molécules d'ADP.

Par contre, lorsque les électrons sont cédés par le $FADH_2$, qui intègre la chaîne respiratoire à un niveau différent, 6 protons seulement sont transférés par paire d'électrons, ce qui autorise la formation de deux ATP seulement.

On peut ainsi dresser le bilan de cette oxydation du groupement acétyl.

Trois NADH ont été produits au cours du cycle de Krebs, soit 9 ATP, 1 $FADH_2$, soit 2 ATP, plus 1 GTP transformé en ATP, donc un total de 12 ATP par tour de cycle.

On peut également établir un bilan plus complet, celui du nombre d'ATP produit par molécule de phosphoglycéraldéhyde. Il faut noter que celui-ci sera différent selon la navette mise en œuvre pour faire pénétrer les électrons et les protons dans la matrice mitochondriale (voir paragraphe D, a, ci-dessus).

Les 3 carbones du triose phosphate ont bien été consommés puisque 3 molécules de dioxyde de carbone ont été dégagées.

Le nombre de molécules d'ATP produit est relativement important ; il est bien entendu fonction de la navette utilisée pour le transfert du pouvoir réducteur dans la matrice.

Avec une navette malate-aspartate

3 ATP	3 ATP
5 NADH	15 ATP
1 $FADH_2$	2 ATP
Nombre total par triose -P	20 ATP

Avec une navette glycérol-phosphate

3 ATP	3 ATP
4 NADH	12 ATP
2 $FADH_2$	4 ATP
Nombre total par triose -P	19 ATP

Comme 2 molécules de glycéraldéhyde phosphate sont obtenues à partir d'1 molécule de glucose, 40 ATP sont formés dans un cas, 38 dans l'autre.

Ceci permet d'établir un bilan énergétique approximatif de la dégradation du glucose. Une

molécule d'ATP pouvant libérer, dans les conditions moyennes, 30 kJ, la molécule de glucose a fourni, au cours de la glycolyse et des oxydations respiratoires, ***en tenant compte des 2 ATP consommés pour activer le glucose :***

$$30 \times 38 = 1\,140\,\text{kJ}$$

avec la navette malate-aspartate ;

$$30 \times 36 = 1\,080\,\text{kJ}$$

avec la navette glycérol-phosphate.

La combustion totale d'1 molécule de glucose, effectuée dans un calorimètre, libère 2823 kJ. Le rendement des oxydations cellulaires est donc, en tenant compte de la navette utilisée :

$$\frac{1\,140}{2\,823} \times 100 = 40{,}38\ \%$$

$$\frac{1\,080}{2\,823} \times 100 = 38{,}26\ \%$$

Si on compare à ce bilan énergétique celui des fermentations qui ne produisent que 2 ATP :

$$\frac{2 \times 30}{2\,823} \times 100 = 2{,}13\ \%$$

on peut apprécier l'énorme avantage qu'apportent les oxydations respiratoires mitochondriales.

Ce qu'il convient également de souligner, c'est que ces dégradations se produisent par étapes, *sans libération brutale d'énergie*, en transférant celle-ci sur l'ATP, dont nous avons vu qu'il était l'intermédiaire indispensable dans toutes les réactions biochimiques.

Le bilan de l'activité mitochondriale ne doit pas cependant être limité au seul bilan énergétique.

De très nombreux résidus d'acides aminés sont intégrés dans le cycle de Krebs *(fig. VIII-26)*, où ils sont dégradés, certains d'entre eux avec production de corps cétoniques.

Inversement, certains intermédiaires du cycle de Krebs sont utilisés comme précurseurs pour la synthèse des aminoacides.

Enfin, à partir de l'oxaloacétate et du pyruvate, il peut y avoir, par un mécanisme inverse de la glycolyse, formation d'hexose : il y a glucogenèse.

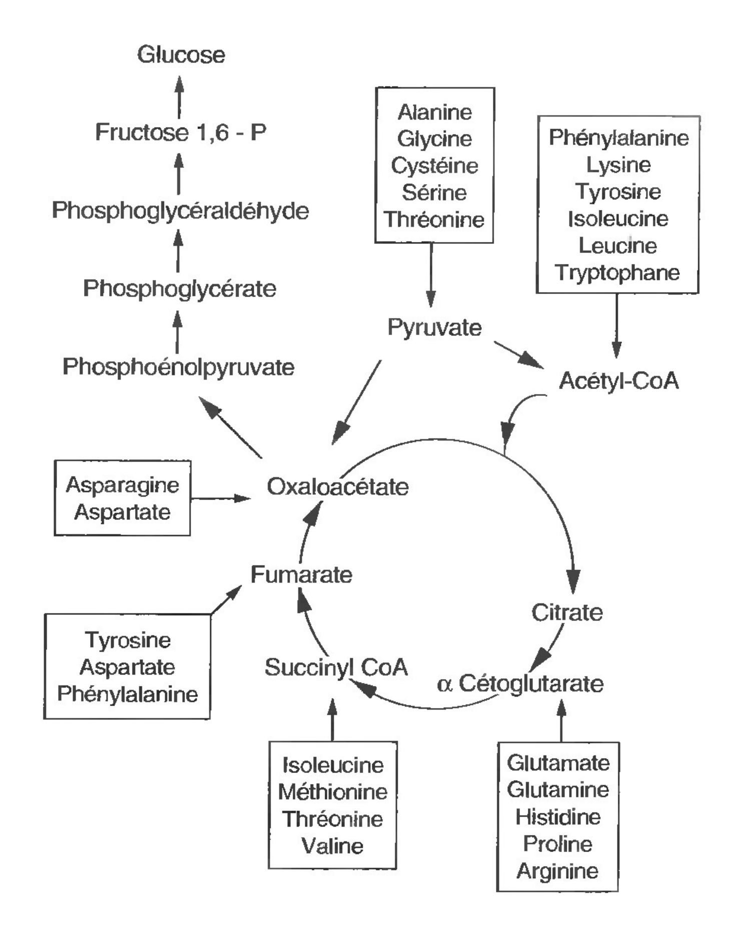


Fig. VIII-26 : **Cycle de Krebs, glucogenèse et dégradation des acides aminés.**

La mitochondrie, et plus particulièrement le cycle de Krebs, apparaît donc comme ***un élément central du métabolisme cellulaire*** vers lequel convergent et d'où partent de fort nombreuses voies biochimiques.

2.2. LES CHLOROPLASTES ET LA PHOTOSYNTHÈSE

Les chloroplastes sont des organites rencontrés uniquement chez les végétaux (algues et végétaux supérieurs) qui présentent l'énorme avantage de synthétiser des glucides à partir de dioxyde de carbone et d'eau, en utilisant l'énergie solaire comme source d'énergie. Ils confèrent aux végétaux un rôle fondamental dans la biosphère, celui d'être capables d'élaborer des molécules organiques à partir d'éléments minéraux : les végétaux sont *autotrophes ; ce sont des **producteurs primaires***.

A. *Organisation ultrastructurale du chloroplaste des végétaux supérieurs*

La forme et l'organisation des chloroplastes sont très variées chez les algues, mais relativement constantes chez les végétaux supérieurs (des mousses aux angiospermes).

Chez celles-ci, le chloroplaste est un organite de forme lenticulaire dont les dimensions sont généralement comprises entre 3 et 10 µm.

Sur les coupes fines de matériel végétal, une feuille par exemple, observées en microscopie électronique *(fig. VIII-27, A, et 34)*, il apparaît limité par une enveloppe, c'est-à-dire une membrane interne et une membrane externe. Ces deux membranes ont un contour régulier et limitent un espace intermembranaire d'épaisseur généralement constante.

À l'intérieur de cette enveloppe se trouve un *stroma* dense dans lequel on observe plusieurs sortes d'inclusions : *des nucléoïdes*, générale-

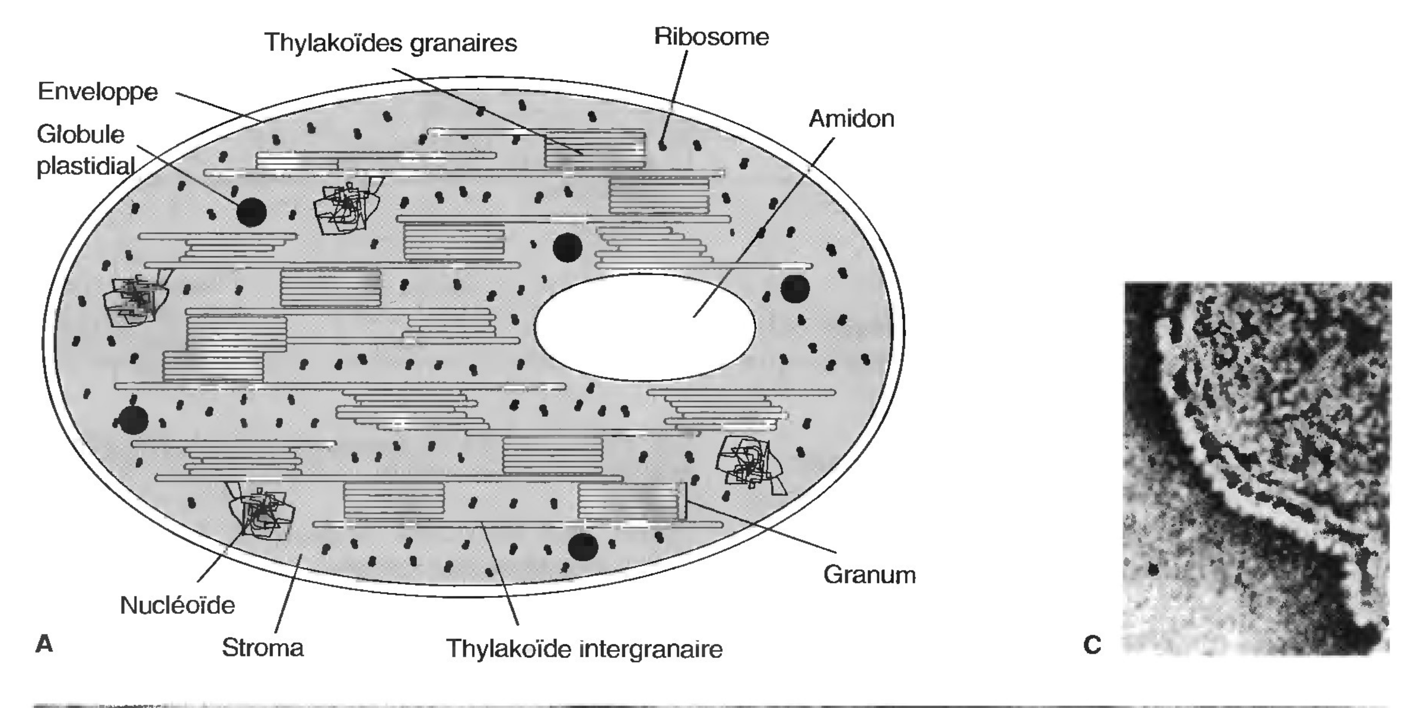




Fig. VIII-27 : Chloroplaste d'un végétal supérieur.

A) Schéma réalisé d'après une coupe ultrafine observée en microscopie électronique.

B) Coupes transversales de grana observées en microscopie électronique (IG : thylakoïdes intergranaires ou stromatiques ; G, thylakoïdes granaires). G. x 100 000.

C) ATP-synthases sur la face stromatique d'un thylakoïde de chloroplaste d'Epinard. G. x 200 000.

(B, reproduit de L.A. STAEHELIN. Regulation of chloroplast membrane functions. J Cell Biol 1983 ; 97 : 1327-1337).
(C, reproduit de R. BRONCHART. Mise en évidence de particules globulaires pédonculées. C R Acad Sc Paris 1965 ; 260 : 4564-4567.)

ment associés à la membrane interne ou au système lamellaire interne, des *ribosomes*, des globules denses, vraisemblablement lipidiques, *les globules plastidiaux*, et, si le chloroplaste a été fixé après une période suffisamment longue d'exposition à la lumière, un ou plusieurs *grains d'amidon.*

L'élément le plus marquant, visible dans le stroma, est un système membranaire interne, limitant des sacs clos, ***les thylakoïdes***. Ces thylakoïdes, *totalement indépendants de la membrane interne*, se répartissent en deux catégories: les uns discoïdes, empilés comme des pièces de monnaie, forment les grana (un granum), ce sont *les thylakoïdes granaires*; les autres beaucoup plus longs circulent dans le stroma sous forme de nappes très étendues, reliant les différents grana, ce sont les *thylakoïdes intergranaires ou stromatiques (fig. VIII-27, B).*

L'organisation des thylakoïdes est en réalité fort complexe si l'on considère leur agencement dans l'espace interne du plaste. L'examen de coupes sériées a toutefois révélé deux éléments importants qui joueront un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'organite: les cavités de tous les thylakoïdes sont en communication, il y a donc *un compartiment intrathylakoïde unique*; ce compartiment est *indépendant de l'enveloppe*; on l'appelle le *lumen.*

Dans le chloroplaste il y a en conséquence trois compartiments séparés par des membranes: l'espace intermembranaire, le stroma, le lumen des thylakoïdes.

Sur les thylakoïdes, dans les zones où ils sont en contact avec le stroma, on observe des particules pédonculées, très comparables à celles rencontrées sur la membrane mitochondriale interne, ce sont là aussi des *ATP-synthases.*

B. Composition chimique

Les chloroplastes sont des organites volumineux qu'il est relativement aisé de séparer par centrifugation après avoir broyé les cellules *(fig. VIII-28)*. On peut alors analyser séparément les différentes fractions chloroplastiques.

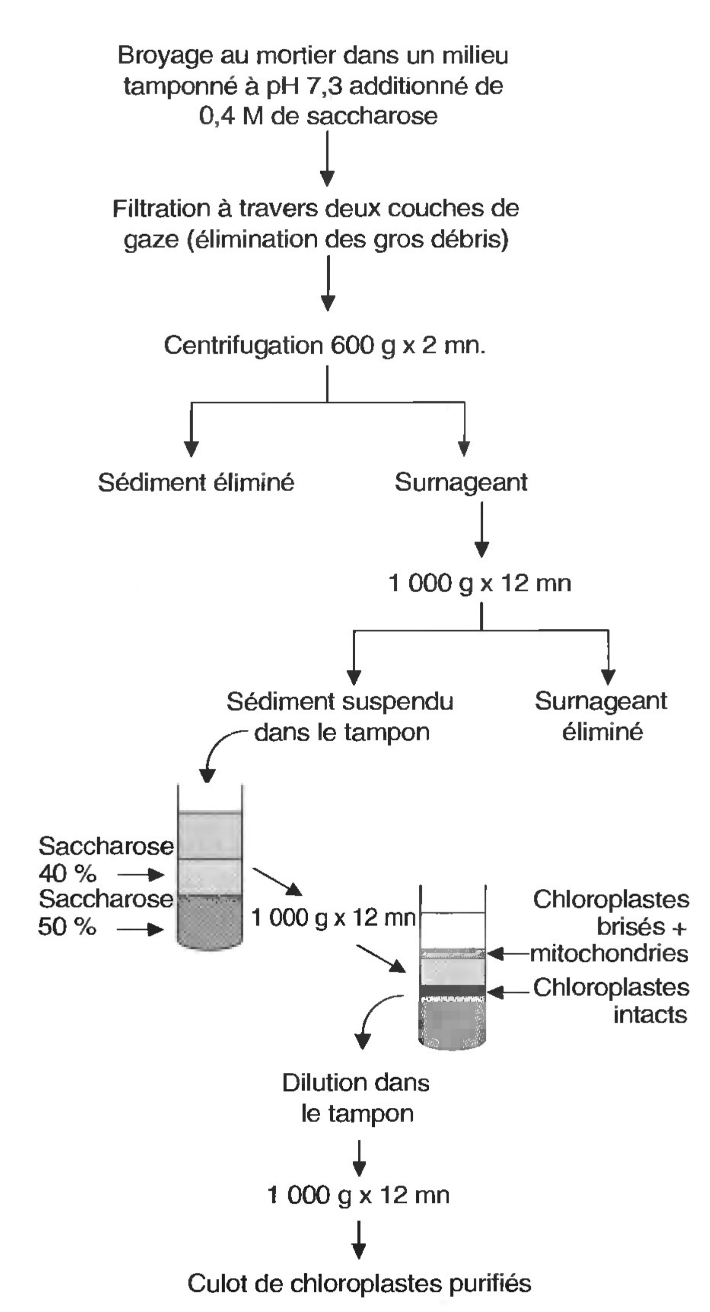


Fig. VIII-28: Une méthode permettant d'isoler les chloroplastes.
(D'après R.M. LEECH, 1966.)

a. Les membranes externe et interne, l'espace intermembranaire

Les deux membranes, interne et externe, se distinguent des autres membranes cellulaires par leur teneur élevée en *galactolipides*. Des différences de composition chimique existent entre elles, mais c'est principalement sur le plan fonctionnel qu'elles diffèrent.

La membrane externe est très perméable aux molécules de faible masse moléculaire,

alors que l'interne régule les échanges cytoplasme-stroma ; c'est elle qui contient les très nombreux transporteurs nécessaires.

b. La membrane des thylakoïdes

Les thylakoïdes sont constitués par des membranes de 8,5 nm d'épaisseur, contenant 40 % de lipides, 50 % de protéines et 10 % de pigments.

Les lipides, dont les plus abondants sont des galactolipides, se caractérisent par une très forte teneur en *acides gras insaturés*, notamment en acide linolénique, un 18:3 (voir chapitre sur les lipides, p. 95), ce qui va conférer **une très grande fluidité à cette membrane** ; *les particules intégrées se déplaceront très aisément dans le plan d'étalement du thylakoïde.*

Les protéines sont très diverses. Certaines sont associées aux pigments avec lesquels elles forment de volumineux complexes ; d'autres sont des ATP-synthases dont l'organisation moléculaire, dans laquelle on distingue une partie intégrée à la membrane (F_0) et une partie exposée dans le stroma (F_1), est très comparable à celle des particules recouvrant la matrice mitochondriale interne *(fig. VIII-13)* ; d'autres enfin sont des transporteurs ou associés à des transporteurs d'électrons et de protons.

Les transporteurs peuvent, comme dans la mitochondrie, être répartis en deux catégories :

– des transporteurs d'électrons et de protons, ce sont des quinones, formant *le pool des plastoquinones (fig. VIII-29)* ;

– des transporteurs d'électrons seuls parmi lesquels on distingue *des cytochromes* (f, b_6), *des protéines fer-soufre, la ferrédoxine* (un type particulier de protéine fer-soufre), *la plastocyanine,* une protéine contenant du cuivre.

Les pigments photorécepteurs se répartissent, chez les végétaux supérieurs, en deux catégories : les chlorophylles et les caroténoïdes.

Les chlorophylles sont des pigments verts, facilement extraits des tissus végétaux par les solvants organiques, éther ou éthanol. Au point de vue chimique, ce sont des tétrapyrroles *(fig. VIII-30)* où chacun des noyaux pyr-

Fig. VIII-30 : Chlorophylle a.
A) Formule.
B) Orientation de la queue phytol par rapport au plan des noyaux pyrrole.

Fig. VIII-29 : Fixation de 2 électrons et de 2 protons par une plastoquinone.

role est uni par des liaisons de coordinence à un atome de magnésium central *.

Deux chlorophylles sont présentes chez les végétaux supérieurs, la *chlorophylle a* et la *chlorophylle b*; les deux molécules portent une très longue chaîne carbonée hydrophobe (20 carbones); orientée perpendiculairement au plan des noyaux pyrrole, elle permet l'insertion de la molécule dans la membrane; ces chlorophylles se distinguent l'une de l'autre par un seul groupement chimique, le groupement CH_3 de la chlorophylle a *(fig. VIII-30, flèche)* est remplacé par un groupement CHO dans la chlorophylle b.

Les caroténoïdes des plastes des végétaux supérieurs se répartissent en deux catégories: les carotènes et les xanthophylles. Ce sont des pigments de couleur jaune ou orangée extraits des tissus végétaux par les solvants organiques.

Les carotènes sont des carbures d'hydrogène dont le plus représenté dans les feuilles des végétaux est le *β-carotène (fig. VIII-31)*.

Les xanthophylles sont des dérivés oxydés des carotènes, portant des fonctions alcool, cétone... La plus abondante dans les feuilles des végétaux supérieurs est la *lutéine (fig. VIII-31)*.

Ces pigments ont le pouvoir de capter les photons car ils possèdent un réseau simple de doubles liaisons conjuguées où les doublets d'électrons, assurant les liaisons π entre les atomes, ne sont pas situés très exactement autour de ces atomes, mais *délocalisés* sur l'ensemble des cycles; les orbitales moléculaires qu'ils décrivent intéressent un volume important et leurs niveaux d'énergie sont voisins.

L'énergie associée à un photon (hυ) pourra faire changer d'orbitale l'électron avec lequel il rentre en collision; celui-ci passe alors d'une orbitale saturée dont le niveau d'énergie est E_0 sur une autre insaturée dont le niveau d'énergie, plus important, est E_n *(fig. VIII-32)*. On comprend donc l'intérêt que présentent les orbitales des pigments, très étendues mais voisines au point de vue énergétique, pour le captage des photons.

Le fait important à comprendre est que ce transfert doit utiliser *la totalité de l'énergie apportée par le photon*. Cette énergie varie avec la longueur d'onde: plus celle-ci est faible, plus l'énergie est importante.

Un photon de longueur d'onde donnée ne pourra donc faire changer d'orbitale que l'électron pour qui l'apport énergétique correspond à l'exacte différence entre les niveaux énergétiques des deux orbitales, celle où il se trouve et celle où il est susceptible d'être transféré. Il existe donc un rapport étroit entre la nature de la radiation absorbée et le pigment. Les spectres d'absorption des pigments *(fig. VIII-33)* permettent donc d'apprécier leur organisation moléculaire.

Les chlorophylles a et b présentent deux pics d'absorption maximale situés à 663 et 430 nm pour la première, à 645 et 445 nm pour la seconde; elles absorbent donc dans le bleu et le rouge et laissent passer les photons de longueur d'onde intermédiaire; elles apparaissent donc vertes par transparence. Bien

β-carotène

HO H H OH H

Lutéine

Fig. VIII-31 : Caroténoïdes des végétaux supérieurs.

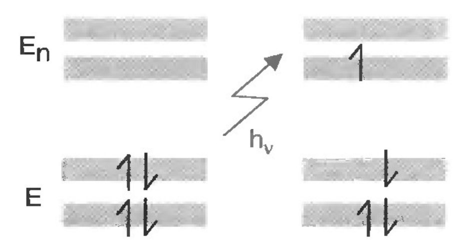


Fig. VIII-32: Absorption d'un photon et transfert d'un électron sur une orbitale plus externe non saturée.

* On notera la similitude structurale entre la molécule de chlorophylle et l'hème rencontré dans les cytochromes, la myoglobine, l'hémoglobine; dans la première toutefois un atome de magnésium remplace l'atome de fer de l'hème.

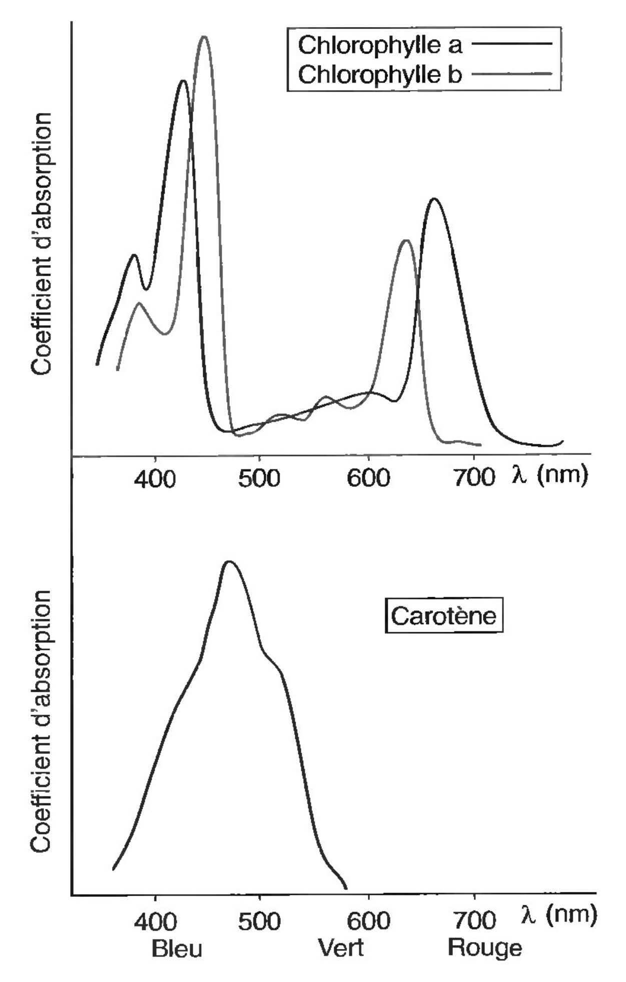


Fig. VIII-33 : Spectre d'absorption des chlorophylles et du carotène.

qu'il y ait deux pics d'absorption, seul celui correspondant à la longueur d'onde la plus grande est utilisable pour la photosynthèse.

Les caroténoïdes absorbent vers 450 nm, ils sont jaunes ou orangés.

Un point très important à noter, pour comprendre ultérieurement le mécanisme photosynthétique, est que la longueur d'onde absorbée par un pigment ne dépend pas uniquement de l'agencement des atomes dans sa molécule, elle est aussi fonction de *l'environnement*. Or dans les membranes des thylakoïdes, les pigments sont associés à des polypeptides, formant des complexes pigmentaires se distinguant les uns des autres par la longueur d'onde absorbée, la nature du pigment et celle des polypeptides avec lesquels il est associé. *On trouve ainsi pour la chlorophylle a différents complexes absorbant à 660, 670, 680, 700 nm.*

c. Le stroma

La substance fondamentale du plaste, le stroma, est un milieu réactionnel extrêmement complexe où l'on trouve les très nombreuses enzymes impliquées dans les synthèses de glucides et autres métabolites, des ions, des molécules organiques résultant de l'activité photosynthétique ; il apparaît donc extrêmement dense en microscopie électronique *(fig. VIII-34).*

On y rencontre également des nucléoïdes, des ribosomes et les différentes enzymes et ARN impliquées dans la synthèse des protéines : il y a donc, comme chez les mitochondries, duplication, transcription et traduction.

L'ADN est circulaire de 40 à 50 µm de circonférence, composé de 120 à 190 kilobases ; il n'est pas associé à des histones. Il existe plusieurs nucléoïdes par chloroplaste ; ils sont accolés à la membrane interne ou à celle des thylakoïdes. Cet ADN code pour les ARN ribosomaux, les ARNt et des protéines des plastes. Les plastoribosomes, comme les ribosomes mitochondriaux, sont plus petits que ceux du cytoplasme et ressemblent beaucoup aux ribosomes bactériens. Les enzymes intervenant dans la duplication, la transcription et la traduction sont, là aussi, de type procaryote.

Le nombre de paires de bases contenu dans l'ADN chloroplastique est suffisant pour coder les ARNr, les ARNt et environ 80 protéines. Or, on connaît plus de 200 polypeptides différents dans un chloroplaste ; certains d'entre eux sont donc codés en dehors de l'organite, dans le noyau et synthétisés dans le cytoplasme. La situation est donc une nouvelle fois comparable à celle des mitochondries : *il y a coopération entre les génomes nucléaire et plastidial, les plastes sont, eux aussi, des organites semi-autonomes.*

L'importance de cette coopération peut être appréciée en utilisant des inhibiteurs spécifiques comme cela était fait pour la mitochondrie (voir p. 330) : on constate alors que si certains complexes fonctionnels intégrés aux membranes des thylakoïdes sont constitués par l'étroite juxtaposition de polypeptides synthétisés dans le cytoplasme et de polypeptides élaborés dans le stroma, d'autres sont unique-

Fig. VIII-34 : Chloroplaste dans une feuille d'Angiosperme dicotylédone (feuille de basilic).
La fixation ayant été réalisée après une période d'obscurité, il n'y a pas d'amidon dans le stroma (S) ; noter la densité de ce compartiment où s'observent des nucléoïdes (n). La feuille étant jeune, les globules plastidiaux (Gp) sont peu nombreux et les grana peu développés. En, enveloppe plastidiale ; m, mitochondrie ; P, paroi ; t, tonoplaste ; Tg, thylakoïdes granaires ; Tig, thylakoïdes intergranaires ; V, vacuole. G. x 35 000.
(Cliché D. ROBERT.)

ment formés de protéines importées *(fig. VIII-35)* ; certains complexes enzymatiques du stroma, comme la rubisco, sont également constitués par l'assemblage de sous-unités codées dans le noyau et d'autres codées par les nucléoïdes.

Cette étroite participation des deux génomes à l'édification des complexes protéiques plastidiaux pose le problème de la pénétration des polypeptides dans l'organite : l'adressage est en effet plus complexe que celui observé chez les mitochondries dans la mesure où un troisième système membranaire est impliqué, celui des thylakoïdes. La traversée de l'enveloppe plastidiale est fort comparable à celle rencontrée chez la mitochondrie (voir p. 331),

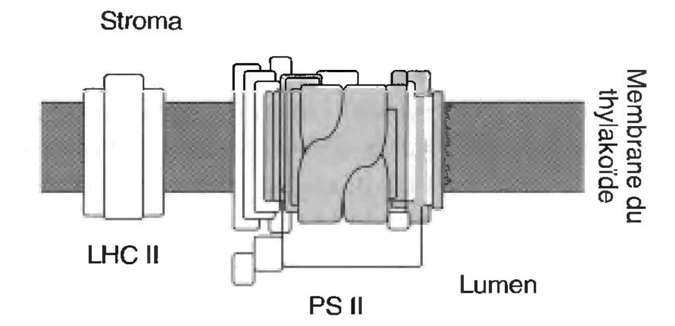


Fig. VIII-35 : Participation des génomes nucléaire et chloroplastique à l'édification des complexes macromoléculaires des thylakoïdes.
Inséré dans la membrane du thylakoïde (en gris), le complexe PS II se révèle constitué par l'association de polypeptides codés par le génome du plaste (figurés en rouge) et de polypeptides importés du cytosol (représentés en blanc), l'information correspondante étant d'origine nucléaire. L'antenne, LHC II, est par contre entièrement formée par des polypeptides importés.

c'est-à-dire que les protéines destinées au stroma ou à la membrane interne de l'enveloppe sont synthétisées dans le cytosol *avec une séquence additionnelle, CTS (p. 245), à l'extrémité N-terminale (fig. VIII-36)*; dès la sortie du ribosome la protéine interagit avec un chaperon, une HSP 70 ATP dépendante, ce qui permet le maintien du polypeptide sous forme déployée; la séquence signal est identifiée par un récepteur de la membrane externe, ce qui permet l'introduction de la protéine dans un canal transmembranaire. La traversée proprement dite diffère toutefois de celle rencontrée chez la mitochondrie, car entre les membranes externe et interne du plaste, il n'y a pas de gradient électrochimique $\Delta\psi$; l'élément moteur est un autre chaperon, une HSP 100, qui utilise de l'ATP pour réaliser ce transfert; c'est donc un système un peu plus coûteux que celui mis en œuvre chez la mitochondrie.

La véritable originalité du plaste tient à ce que toutes les protéines ayant pénétré dans le stroma n'ont pas, après excision de la séquence signal, la même destination *(fig. VIII-36)*; certaines acquièrent d'emblée leur conformation tridimensionnelle et, s'associant éventuellement à d'autres élaborées par les plastoribosomes, constituent des enzymes fonctionnelles, comme par exemple la rubisco. Par contre celles destinées à l'appareil photosynthétique doivent pénétrer dans le lumen ou s'intégrer à la membrane des thylakoïdes, *ce qui suppose un autre système d'adressage et d'insertion.* Celui-ci est constitué par une séquence signal additionnelle, située immédiatement après celle ayant servi à la traversée de l'enveloppe, c'est-à-dire en fait derrière celle précisant la destinée plastidiale de la macromolécule. Cette seconde séquence signal, qui n'intervient qu'après élimination de la première dans le stroma, est elle-même excisée par une peptidase à l'intérieur du lumen.

Les mécanismes mis en jeu pour réaliser ces transferts sont donc fort comparables à ceux utilisés pour la pénétration dans les cavités du réticulum endoplasmique ou la matrice mitochondriale; c'est seulement en raison de la structure du chloroplaste que les modalités sont plus complexes.

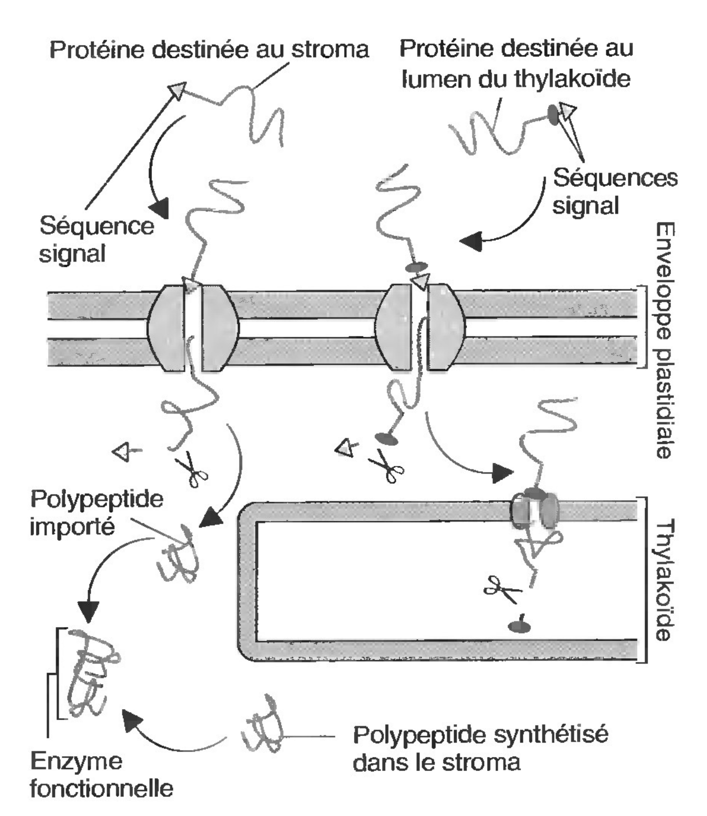


Fig. VIII-36: Import de protéines du cytosol par le chloroplaste.
L'import de protéines stromatiques est réalisé par l'intermédiaire de complexes d'identification situés au niveau de l'enveloppe de l'organite; ces derniers reconnaissent une séquence signal située en position N-terminale du polypeptide importé (partie gauche du schéma). Les protéines à destination de l'appareil photosynthétique sont pourvues d'une seconde séquence signal, qui, après pénétration dans le stroma et excision de la première, peut être identifiée par les systèmes de reconnaissance intégrés à la membrane du thylakoïde (partie droite du schéma).

C. La photosynthèse et les autres fonctions plastidiales

La première des fonctions plastidiales est la synthèse des glucides à partir de dioxyde de carbone et d'eau.

a. La synthèse des glucides dans le stroma

Elle se produit dans le stroma et on a pu en suivre les étapes en utilisant une algue d'eau douce, la chlorelle, se développant en milieu artificiel dans un environnement contrôlé *(fig. VIII-37)*.

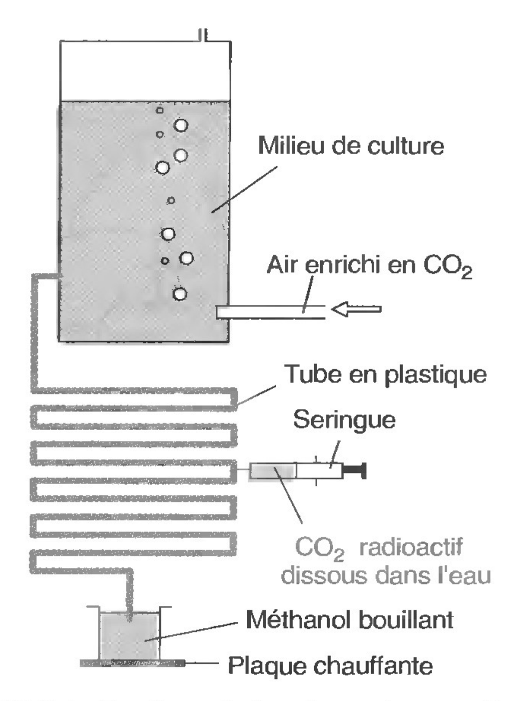


Fig. VIII-37 : **Système à écoulement permettant un court marquage par le $^{14}CO_2$.**

À partir du flacon où sont cultivés ces organismes, un tube relativement long débouche dans un récipient où se trouve de l'alcool bouillant. Dès que les algues atteignent ce liquide, elles sont tuées et toutes les réactions biochimiques cessent.

Si l'on injecte dans le tube, à l'aide d'une seringue, du dioxyde de carbone radioactif, $^{14}CO_2$, celui-ci sera incorporé dans les oses au cours de la période mise par les cellules pour atteindre l'alcool bouillant. Plus l'injection est éloignée de l'extrémité du tube, plus le temps de contact entre le précurseur et la cellule est long et plus nombreux sont les oses marqués ; plus l'injection est proche de l'extrémité, moins il y a de composés organiques radioactifs. On peut ainsi déterminer la nature des premiers produits élaborés et établir l'ordre de leur formation.

Le premier produit radioactif est le phosphoglycérate. Il est formé par fixation d'une molécule de CO_2 sur un pentose, le ribulose 1,5-bisphosphate, donnant naissance à un hexose intermédiaire qui est aussitôt clivé en deux phosphoglycérates *(fig. VIII-38)*.

Cette réaction est réalisée dans le stroma par une enzyme, la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, la **rubisco**. Cette réaction ne nécessite aucun *apport énergétique*, mais elle est extrêmement lente ; il y a donc dans les cellules qui photosynthétisent une grande quantité de cette enzyme (elle forme environ 50 % des protéines du stroma) ce qui, compte tenu du nombre important de chloroplastes présents dans la cellule et de l'importance des végétaux chlorophylliens à la surface terrestre, fait que *cette enzyme est la plus abondante sur la planète*.

Le phosphoglycérate est immédiatement réduit en un premier ose, le phosphoglycéraldéhyde suivant la réaction :

$$\text{3-phosphoglycérate} + NADPH + H^+ + ATP \rightarrow \text{3-phosphoglycéraldéhyde} + ADP + NADP^+ + Pi$$

Le coenzyme de déshydrogénase utilisé ici n'est pas la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) mais un dérivé possédant un groupe phosphate la NADP *(fig. VIII-39)*.

C'est donc pour réduire le phosphoglycérate en un premier ose, un triose, le phosphoglycéraldéhyde, qu'une molécule d'ATP est nécessaire.

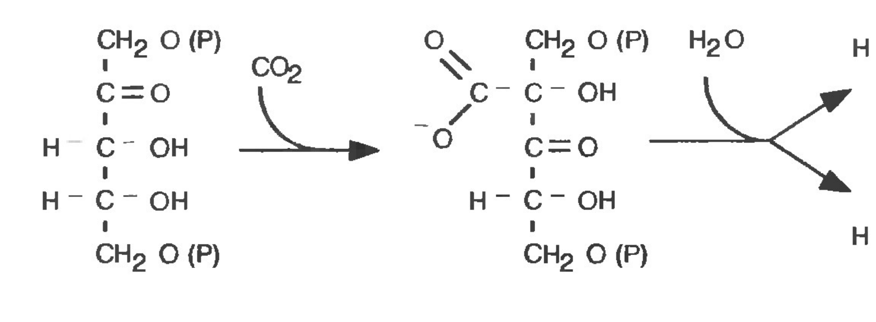


Fig. VIII-38 : **Fixation de CO_2 et formation de 2 phosphoglycérates à partir de ribulose 1-5 bisphosphate.**

Phosphate

Nicotinamide

Ribose

Phosphate

Adénine

Ribose

Phosphate

Fig. VIII-39 : La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), formes réduite et oxydée.

Deux molécules de phosphoglycérate sont produites lorsqu'un CO_2 est fixé*; une molécule de ribulose 1,5-P est consommée. Pour que le processus puisse se reproduire, il est nécessaire que ce pentose soit régénéré. Cette régénération est réalisée par une suite d'interconversions d'oses représentées schématiquement sur la *figure VIII-40*.

Le mécanisme réel est complexe puisque, à partir des 5 phosphoglycéraldéhydes, de nombreuses enzymes vont intervenir permettant une série de condensations, de clivages, d'isomérisations, dont l'ensemble constitue le cycle de *CALVIN-BENSON (fig. VIII-41)*; il permet la régénération du ribulose et la synthèse d'un hexose.

La réduction du phosphoglycérate en un premier ose, le phosphoglycéraldéhyde, nécessite donc de l'ATP et un réducteur, le NADPH.

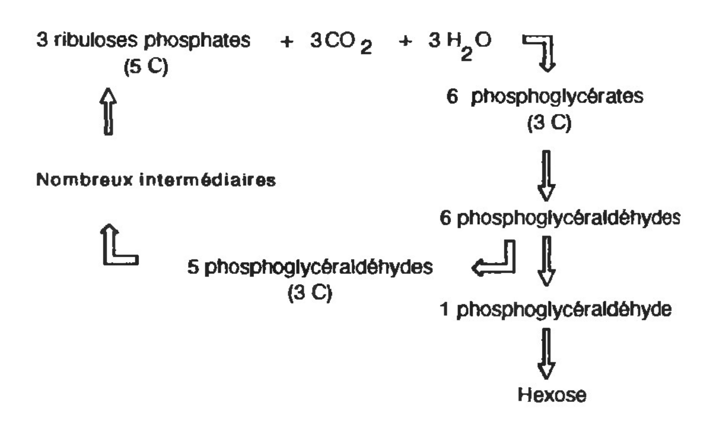


Fig. VIII-40 : Premières molécules formées au cours de la photosynthèse.

* Outre la fixation du CO_2, la rubisco peut catalyser l'oxygénation du ribulose bisphosphate ; cet ose se trouve alors clivé en phosphoglycérate (C3) et en phosphoglycolate (C2) ; par une série complexe d'échanges entre chloroplaste-mitochondrie-peroxysome, deux molécules de phosphoglycolate sont transformées, avec consommation d'ATP, en une molécule de phosphoglycérate ; il y a dégagement de CO_2, c'est la *photorespiration* qui accompagne la photosynthèse chez de nombreuses plantes.

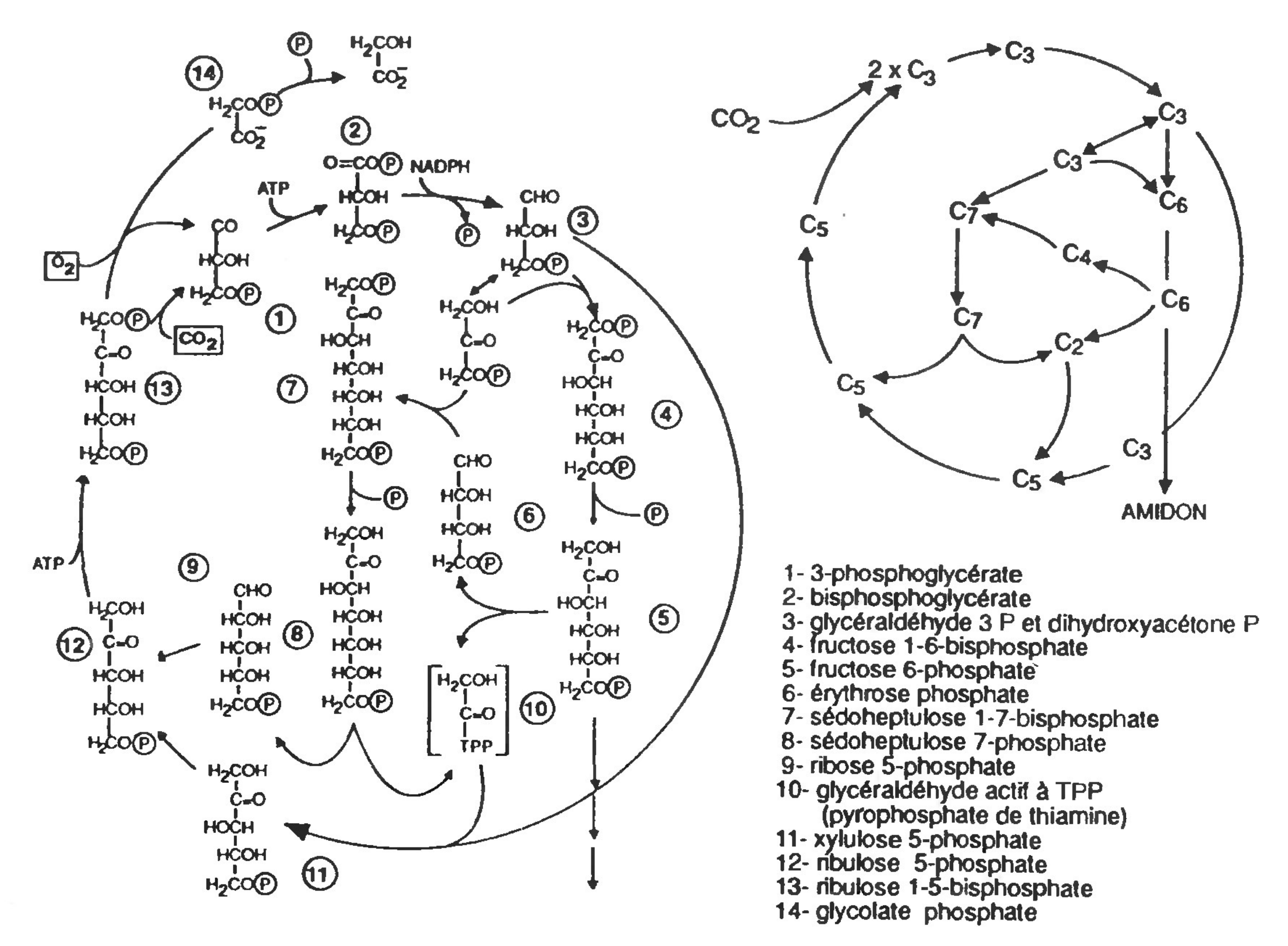


Fig. VIII-41 : **Cycle de Calvin-Benson.**

b. La membrane photosynthétique : création d'un pouvoir réducteur et synthèse d'ATP

Nous avons vu que les molécules pigmentaires sont capables, en capturant un photon de longueur d'onde déterminée, de faire passer, en 10^{-15} seconde environ, un électron d'une orbitale interne saturée sur une orbitale plus externe, inoccupée, de niveau énergétique plus élevé. *La molécule est dite **excitée** (*).*

$$\text{Chl} + h\nu \rightarrow \text{Chl}^*$$

Cet état est fort instable. Il y a très rapidement un retour à l'état initial. Celui-ci peut s'effectuer par différentes voies :

– par conversion interne, avec dissipation de chaleur ;

– par émission d'un photon de fluorescence de longueur d'onde supérieure à celle du photon ayant produit l'excitation ;

– par transfert d'énergie à un autre pigment, dans la mesure où celui-ci est suffisamment proche et où les longueurs d'onde qu'il absorbe sont supérieures à celle du pigment excité, **c'est-à-dire que l'on a toujours transfert dans le sens caroténoïdes → chlorophylle b → chlorophylle a.**

Il peut aussi y avoir transfert d'un électron à un accepteur, si celui-ci est suffisamment proche.

Parmi ces modalités, les trois premières permettent le retour à l'état fondamental ; la dernière, différente, est particulièrement intéressante puisqu'elle permet le démarrage d'une chaîne d'oxydo-réduction.

Toutefois un seul pigment est capable de perdre un électron, c'est une chlorophylle a. Elle passe ainsi de l'état réduit, à l'état oxydé Chl^+.

Ce processus n'est intéressant que dans la mesure où un donneur d'électrons se trouve

également proche de la chlorophylle oxydée ; en effet, en lui cédant un électron, il permet au processus de se reproduire.

Donneur d'électron – chlorophylle a – accepteur d'électrons doivent être suffisamment proches pour que les transferts électroniques puissent se produire. Ils sont maintenus dans une conformation stable par des polypeptides ; l'ensemble forme un **centre réactionnel.**

Le centre réactionnel lui-même, construit autour de chlorophylles a, ne serait sollicité qu'un petit nombre de fois s'il était seul et le rendement photosynthétique serait très faible. C'est pourquoi d'autres pigments lui sont associés (caroténoïdes, chlorophylles b, chlorophylle a), ou plutôt d'autres complexes pigments/protéines, susceptibles d'absorber les photons de divers longueurs d'onde mais incapables de perdre un électron. Ces complexes pigmentaires transfèrent l'énergie qu'ils collectent de proche en proche, en respectant la hiérarchie des transferts dont nous avons parlé, jusqu'à un centre réactionnel *(fig. VIII-42).*

Ces complexes pigments/protéines sont maintenus associés par des polypeptides formant *une antenne collectrice.* Chaque chlorophylle a d'un centre réactionnel reçoit ainsi une énergie suffisante pour fonctionner plusieurs fois par seconde.

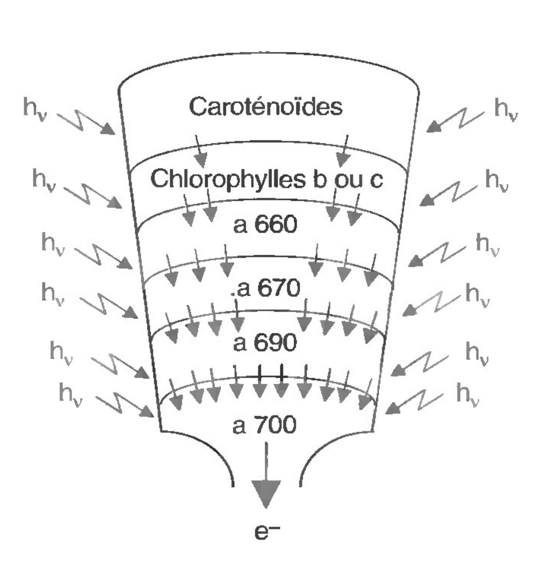


Fig. VIII-42 : Hiérarchie des transferts.
L'énergie est transférée de manière unidirectionnelle, des caroténoïdes vers la chlorophylle a ; ces transferts peuvent toutefois être réalisés d'une manière plus directe, par exemple des caroténoïdes à la chlorophylle a.

Une antenne et un centre réactionnel forment un *photosystème* ou *complexe photosynthétique (fig. VIII-43).*

Il existe deux photosystèmes dans le plaste que l'on qualifie par la longueur d'onde à laquelle fonctionne le centre réactionnel.

Le photosystème II, P 680 car il absorbe à 680 nm, reçoit ses électrons de l'eau ; celle-ci est dissociée par un complexe contenant du manganèse dont la composition et l'organisation sont encore mal connues *(fig. VIII-44)* ; le P 680 transfère les électrons à une suite d'accepteurs :

$$\text{Eau} \xrightarrow{e^-} \text{Z} \rightarrow \textbf{P 680} \rightarrow \text{Phéophytine} \rightarrow \text{Quinones}$$
(Mn) (1er accepteur)

Le photosystème I, P 700 car il absorbe à 700 nm, reçoit ses électrons de la plastocyanine et les transfère à la ferrédoxine.

$$\text{Plastocyanine} \xrightarrow{e^-} \textbf{P 700} \rightarrow \text{protéines fer-soufre} \rightarrow \text{ferrédoxine}$$

Dans la membrane du thylakoïde, chaque photosystème correspond à *un volumineux complexe transmembranaire.*

À côté de ces deux complexes, trois autres ont été identifiés dans la membrane photosynthétique :

Le complexe Cytochrome b_6-f, dans lequel ces transporteurs sont également maintenus associés par de nombreux polypeptides.

Le complexe ATP-synthase dont nous avons vu l'organisation en étudiant la mitochondrie.

L'antenne collectrice mobile, qui n'est associée que temporairement aux complexes P 680 et P 700.

En raison de la fluidité de la membrane ces complexes sont en perpétuel déplacement dans la membrane photosynthétique.

Les transferts d'électrons entre eux sont assurés par des molécules plus petites et très mobiles :

– entre le complexe P 680 et le complexe b_6-f par *le pool des quinones* circulant dans l'épaisseur de la membrane ;

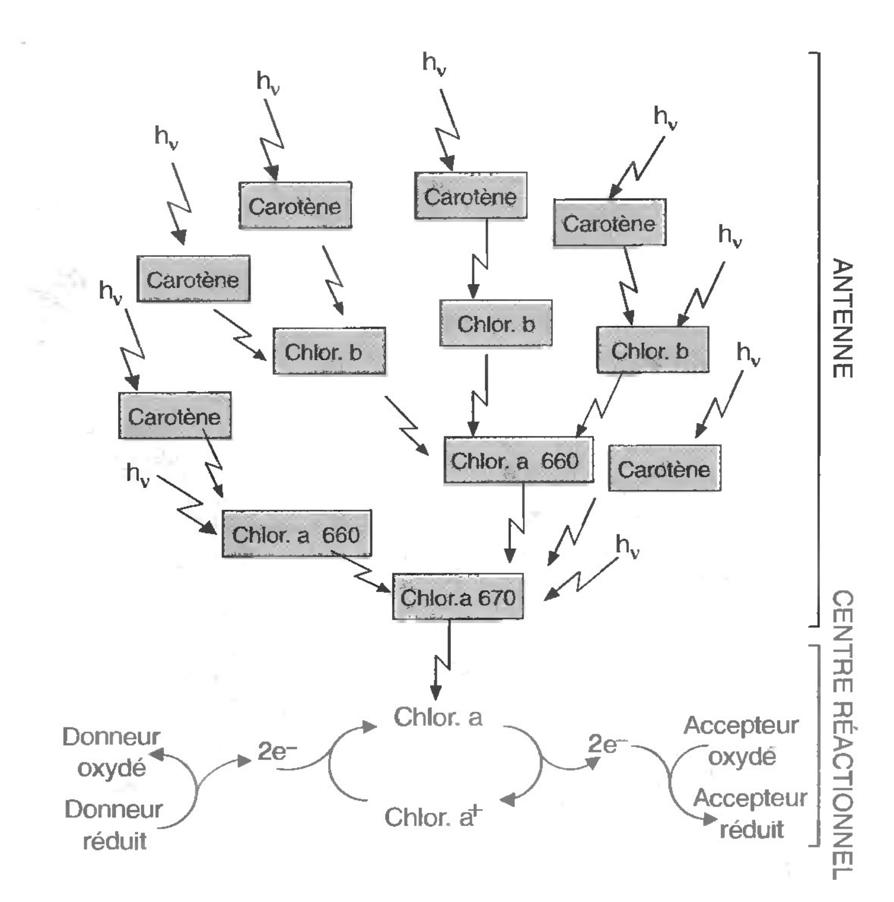


Fig. VIII-43 : Représentation schématique d'une antenne et du centre réactionnel.

– entre le cytochrome b_6-f et le P 700 par la *plastocyanine* qui circule dans le lumen du thylakoïde.

Le transfert des électrons peut être représenté en tenant compte de ces données *(fig. VIII-45)*.

Trois points sont à souligner :

– La dissociation de l'eau libère de l'oxygène, *un sous-produit* qui est dégagé, et des protons qui, après avoir regagné le stroma, sont utilisés, avec les électrons ayant suivi la chaîne des transporteurs, pour réduire le $NADP^+$ nécessaire pour la synthèse du phosphoglycéraldéhyde. Cette réduction est assurée par un volumineux complexe enzymatique, *la NADPH réductase*.

– Le transfert des électrons entre le complexe P 680 et le complexe b_6-f est assuré par un transporteur d'hydrogène, qui reçoit les électrons sur la face stromatique de la membrane, *où il prélève un proton*, et les cède sur la face luminale, *où il cède un proton* ; il s'ensuit *un transport vectoriel des protons*, du stroma vers le lumen *(fig. VIII-46)*. Les protons libérés par ce transport vectoriel et ceux résultant de la dissociation de l'eau s'accumulent dans le lumen du thylakoïde, créant un gradient de pH comparable à celui rencontré dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Comme dans celle-ci, *ce gradient est réduit par l'intermédiaire des ATP-synthases avec formation d'ATP utilisé pour les synthèses.*

–La ferrédoxine peut donner ses électrons aux NADPH, mais elle peut également les céder aux quinones ; dans ce cas, il n'y a pas dissociation de l'eau, mais il y a formation du gradient de protons et donc production d'ATP.

Dans ce processus complexe où l'énergie est fournie par les photons, la membrane photo-

H_2O → $\frac{1}{2}O_2$ + $2H^+$; 2e⁻ ; S+ / S ; Z / Z+ ; Chl.a+ / Chl.a ; e⁻ ; hν

Fig. VIII-44 : Décomposition de l'eau.

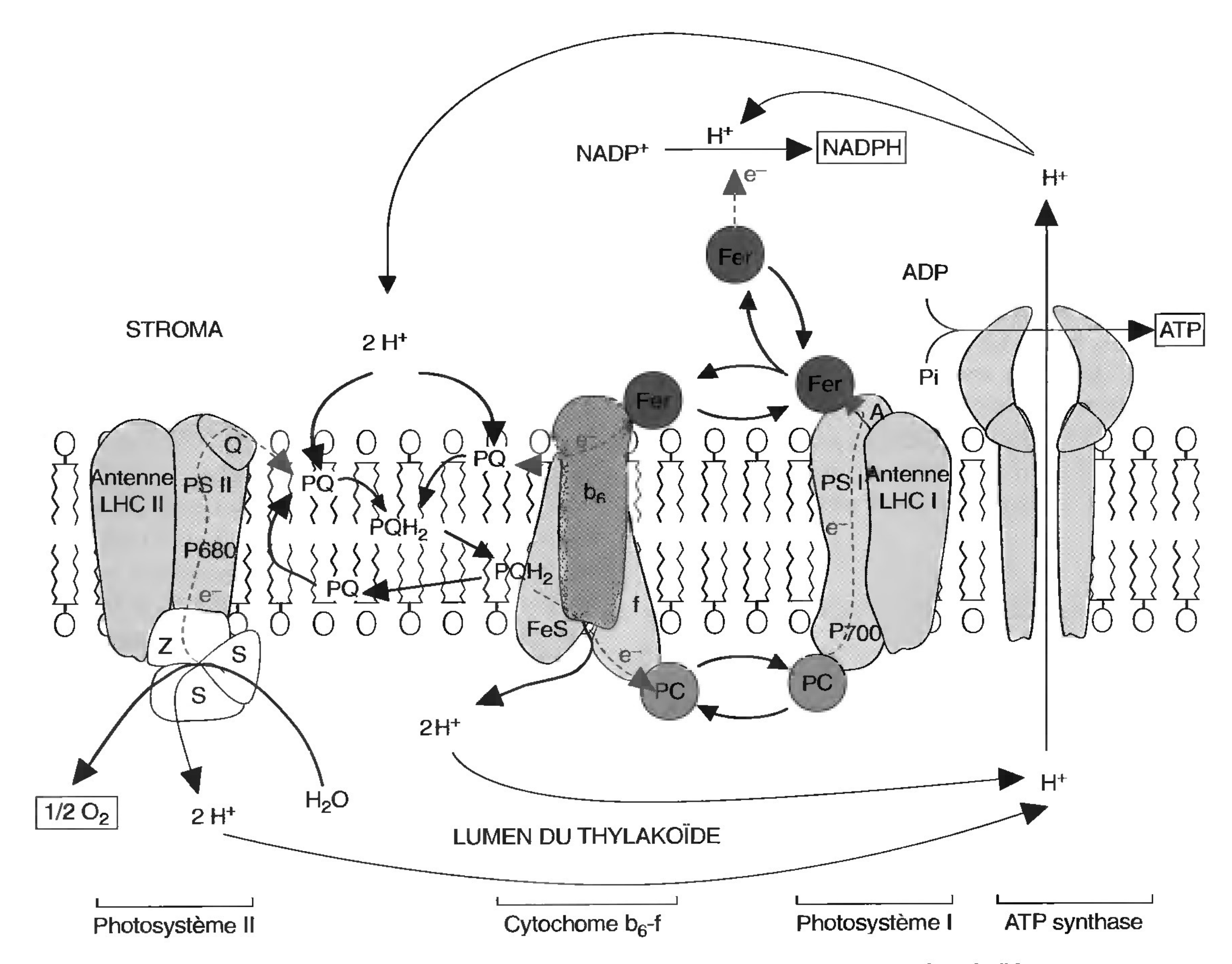


Fig. VIII-45 : Complexes macromoléculaires et transfert de protons au niveau du thylakoïde.
Le complexe PSII assure la décomposition de l'eau et transfère les électrons aux plastoquinones (Q) ; le complexe cytochrome b_6-f reçoit les électrons des quinones et les cède à la plastocyanine (PC) ; le complexe PSI reçoit les électrons de la plastocyanine et les cède à la ferrédoxine (Fer). Entre ces complexes les électrons sont transportés par des molécules plus petites et très mobiles, plastoquinone et plastocyanine. La ferrédoxine distribue ses électrons au NADP (il y a alors production de NADPH, d'ATP et décomposition de l'eau) ou aux cytochromes b_6-f (il y a alors seulement production d'ATP car la photosynthèse n'intéresse que les pigments de PSI).
Les ATP-synthases transmembranaires permettent la synthèse d'ATP en réduisant le gradient de protons.

synthétique, en utilisant comme donneur d'électrons l'eau, a synthétisé l'ATP et créé le pouvoir réducteur indispensable aux synthèses d'oses.

c. Les autres fonctions plastidiales

En utilisant les hexoses produits à partir du phosphoglycéraldéhyde, les chloroplastes sont à même d'élaborer l'amidon ; l'accumulation de celui-ci dans le plaste est toutefois transitoire ; il disparaît au cours de la nuit et gagne les autres parties de la plante.

C'est au niveau des plastes que s'effectuent la réduction des nitrates en ammonium, celui-ci étant immédiatement utilisé pour *synthétiser les aminoacides*. C'est également dans cet organite que sont synthétisés, à partir des ions sulfates, les aminoacides soufrés.

Les chloroplastes jouent donc un rôle capital au point de vue biologique, puisque toutes les molécules organiques sont synthétisées à

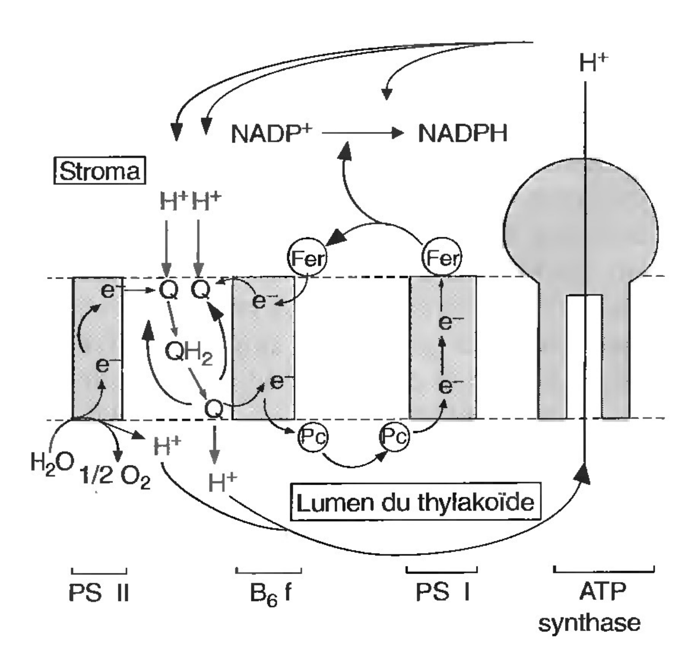


Fig. VIII-46 : Transport vectoriel des protons du stroma vers le lumen du thylakoïde.

partir des oses produits au cours de la photosynthèse et des aminoacides synthétisés en utilisant le pouvoir réducteur engendré au niveau de la membrane photosynthétique.

Les végétaux verts récupèrent ainsi par l'intermédiaire des chloroplastes 1 à 2 % de l'énergie lumineuse reçue à la surface de la terre, ce qui leur permet de fixer environ 7.10^{14} kg de CO_2 et de dégager 5.10^{14} kg d'oxygène. On conçoit ainsi aisément l'importance du rôle joué par les végétaux dans l'équilibre de la biosphère.

3. LA RÉCUPÉRATION DE L'ÉNERGIE CHEZ LES PROCARYOTES

Les Procaryotes font appel à des sources d'énergie extrêmement diverses et mettent en œuvre des procédés très variés pour la récupérer. Quelques exemples permettront de le montrer.

Certaines bactéries utilisent le glucose et synthétisent l'ATP par la voie de la glycolyse, régénérant les coenzymes de déshydrogénases par des fermentations comparables à celles rencontrées dans les cellules eucaryotes. Les produits de la fermentation sont le plus souvent des acides, acide lactique, acide acétique, acide butyrique, acide propionique…

D'autres bactéries oxydent les glucides en CO_2 et H_2O par la glycolyse et le cycle des acides tricarboxyliques. Elles possèdent des chaînes de transporteurs d'électrons fort comparables à celles trouvées dans la mitochondrie ; ces transporteurs d'électrons sont situés dans *la membrane plasmique*. L'accepteur d'électrons n'est pas toujours l'oxygène ; ce peut être un composé azoté (nitrite, nitrate) ou un composé sulfuré (sulfate, sulfite). Ce sont alors des anaérobies strictes.

Dans tous les cas, ces bactéries excrètent des protons *(fig. VIII-47)*, créant un gradient qui est ensuite utilisé (force protomotrice) pour faire pénétrer des métabolites dans la cellule (symport). Dans les bactéries qui possè-

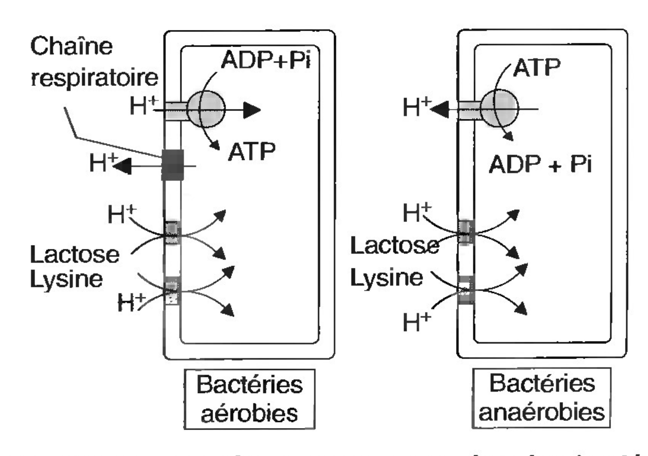


Fig. VIII-47 : Excrétion de protons chez les bactéries.

dent des chaînes de transporteurs d'électrons intramembranaires, le système d'éjection des protons est comparable à celui permettant l'abaissement du pH dans l'espace intermembranaire mitochondrial ; c'est *un transport vectoriel de protons*. Dans les bactéries qui ne possèdent pas ces chaînes de transporteurs, ce sont des ATPases qui *excrètent activement* les protons pour créer cette force protomotrice ; l'ATP utilisé est alors celui produit par la glycolyse.

Certaines bactéries possèdent des pigments chlorophylliens, la bactériochlorophylle, et sont capables de synthétiser des matières organiques à partir d'éléments minéraux ; leur photosynthèse diffère de celle étudiée chez les végétaux surtout en deux points particuliers : un seul photosystème est actif et le donneur d'électrons n'est pas l'eau, c'est souvent de l'hydrogène sulfuré H_2S, l'activité photosynthétique s'accompagnant alors d'un dépôt de soufre (bactéries sulfureuses).

Certains Procaryotes mettent en œuvre un système photosynthétique en tout point comparable à celui rencontré chez les végétaux : ce sont les cyanobactéries. Ces organismes possèdent toutefois un équipement pigmentaire plus varié que celui des végétaux supérieurs car, à côté des chlorophylles et des carotènes, elles possèdent des pigments absorbant les radiations vertes, ce qui leur permet de survivre dans des milieux peu éclairés *.

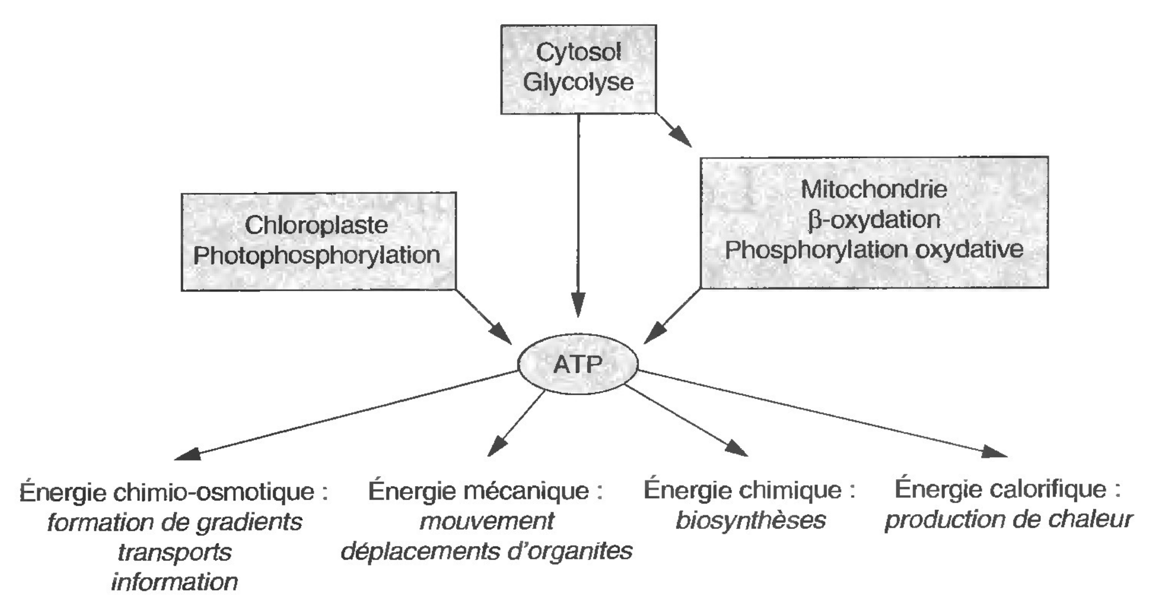
Les bactéries présentent donc une diversité d'organisation et de modes de vie qui leur permet de se développer dans les milieux les plus divers, mais il convient de noter que toutes possèdent dans leurs systèmes membranaires (membrane plasmique des bactéries ou thylakoïdes des cyanobactéries) des ATPases permettant d'engendrer une force motrice protonique, cette force motrice jouant un rôle fondamental dans le métabolisme énergétique de tous les êtres vivants.

* Des pigments comparables, bleu et rouge, se rencontrent chez certaines algues, les algues rouges.

CONCLUSION

Les cellules maintiennent leur structure interne, s'accroissent, se déplacent ou se multiplient en utilisant l'énergie qu'elles prélèvent dans leur environnement ; ce peut être l'énergie lumineuse (cas des organismes photoautotrophes : végétaux, bactéries photosynthétiques et cyanobactéries), l'énergie contenue dans les liaisons covalentes de composés minéraux (organismes chimio-autotrophes : bactéries nitreuses, bactéries nitriques) ou de composés organiques (organismes hétérotrophes : animaux, champignons, la plupart des bactéries). La mobilisation de cette énergie peut être effectuée dans différents compartiments (cytosol, mitochondries, chloroplastes), mais elle n'est jamais brutale ; comme nous l'avons vu, elle est réalisée par étapes et l'énergie recueillie au cours de chacune de celles-ci est transférée sur des composés intermédiaires (coenzymes réduits, nucléotides triphosphates) qui sont susceptibles de la restituer aisément.

Le composé intermédiaire le plus utilisé pour ces transferts d'énergie est l'adénosine triphosphate ou ATP, molécule à haut potentiel de transfert, capable de prélever l'énergie produite par les réactions exergoniques (l'ATP étant alors synthétisée à partir d'ADP et de Pi) et de la restituer pour que puissent être réalisées les réactions endergoniques. Cette molécule joue donc un rôle central chez tous les organismes vivants, Procaryotes et Eucaryotes, animaux et végétaux ; elle n'existe qu'en relativement faible quantité dans la cellule et sa durée de vie est brève, quelques secondes. Elle est donc synthétisée et dégradée en permanence ; **ce n'est pas une molé-**



L'ATP, molécule à haut potentiel de transfert, jouant le rôle d'intermédiaire dans les transferts d'énergie.

cule de stockage. Les cellules, lorsqu'elles stockent de l'énergie, l'immobilisent dans les liaisons covalentes des molécules qu'elles synthétisent (lipides, glucides) et qu'elles peuvent aisément dégrader en fonction de leurs besoins.

Les différents mécanismes mis en œuvre pour synthétiser l'ATP, des bactéries aux organismes supérieurs, présentent des similitudes qui ne paraissent pas être fortuites.

Il semble en effet maintenant bien établi qu'il existe une filiation entre les mitochondries et les plastes des organismes supérieurs et les Procaryotes; les premiers ne seraient que les descendants de bactéries ou de cyanobactéries qui se seraient associées de manière symbiotique aux premiers Eucaryotes.

Cette conception, dite ***théorie endosymbiotique***, s'appuie sur de très sérieux arguments biochimiques : identités structurales des nucléoïdes et des ribosomes; mêmes particularités fonctionnelles des ARN et ADN polymérases...

Elle permet de comprendre les profondes différences existant, chez les organites des Eucaryotes, entre la membrane externe (qui correspondrait à la membrane de la vésicule d'endocytose ayant permis l'intégration du Procaryote) et la membrane interne qui peut être considérée comme le vestige de la membrane plasmique bactérienne.

Bien entendu cette association lointaine a fortement modifié le comportement des deux partenaires initiaux qui sont désormais incapables de se séparer; les échanges se sont en effet produits entre les génomes, certaines fonctions demeurant associées au nucléoïde (l'information initiale du Procaryote), d'autres ayant été transférées au matériel génétique du partenaire. C'est sans doute là que se trouve l'explication de la semi-autonomie des plastes et des mitochondries.

CHAPITRE IX

Les divisions cellulaires

La théorie cellulaire, qui précise que tout organisme est constitué de cellules, implique que toute cellule provient de la division d'une cellule préexistante.

Chez une bactérie comme *Escherichia coli*, les divisions peuvent se succéder à un rythme extrêmement rapide, toutes les 20 à 30 minutes si le milieu contient les éléments indispensables aux synthèses, y compris les nucléotides.

Chez les Eucaryotes, dont l'organisation est plus complexe, le rythme des divisions est moins élevé; certaines cellules peuvent cependant se diviser une fois, voire deux fois par 24 heures.

La division implique le partage de la cellule en deux autres cellules qui présentent les mêmes caractères; c'est ce que l'on nomme *la reproduction conforme*. Ce processus de réplication permet, *si l'on s'en tient aux seules espèces unicellulaires*, de coloniser très rapidement le milieu quand les conditions de l'environnement l'autorisent. Par contre, lorsque celles-ci sont modifiées, ce mode de reproduction peut s'avérer complètement inadapté, la ou les cellules pouvant ne pas posséder l'information génétique susceptible d'adapter le métabolisme aux nouvelles conditions, c'est-à-dire ne pas détenir les gènes codant pour des enzymes nécessaires à son adaptation.

La mise en œuvre chez les Eucaryotes * d'un autre mode de reproduction, *la reproduction sexuée*, est alors une solution; elle est fondée sur l'union de deux cellules, *les gamètes*, apportant chacune une information particulière. La cellule formée, *l'œuf ou zygote*, possède alors dans son noyau deux ensembles chromosomiques sensiblement différents et elle peut ainsi sélectionner la combinaison de gènes qui sera susceptible de répondre le mieux aux conditions environnementales nouvelles.

Cette union des cellules sexuelles, ***la fécondation***, conduit à la formation d'organismes génétiquement originaux, donc à la constitution d'une population hétérogène dans laquelle chaque individu est légèrement différent du voisin.

La cellule-œuf, résultat de la fécondation, possède un double jeu de chromosomes, c'est une cellule *diploïde*; les cellules qui lui ont donné naissance en possèdent un jeu simple, elles sont *haploïdes*. Pour qu'une nouvelle fécondation puisse se réaliser, il est donc nécessaire que soit mis en œuvre un mécanisme permettant *la réduction quantitative précise du nombre des chromosomes* en réalisant le partage exact du matériel génétique, c'est ***la méiose***. En conséquence, ce mode de division particulier apparaît comme *le mécanisme compensateur de la fécondation.*

Il y a ainsi mise en place d'un cycle dont les deux points clefs sont la méiose formant des cellules haploïdes aptes à devenir des gamètes et la fécondation qui aboutit au zygote diploïde; on qualifie les deux périodes ainsi

---

* Des échanges d'informations entre cellules existent aussi chez les Procaryotes; leur étude sort toutefois du cadre de cet ouvrage.

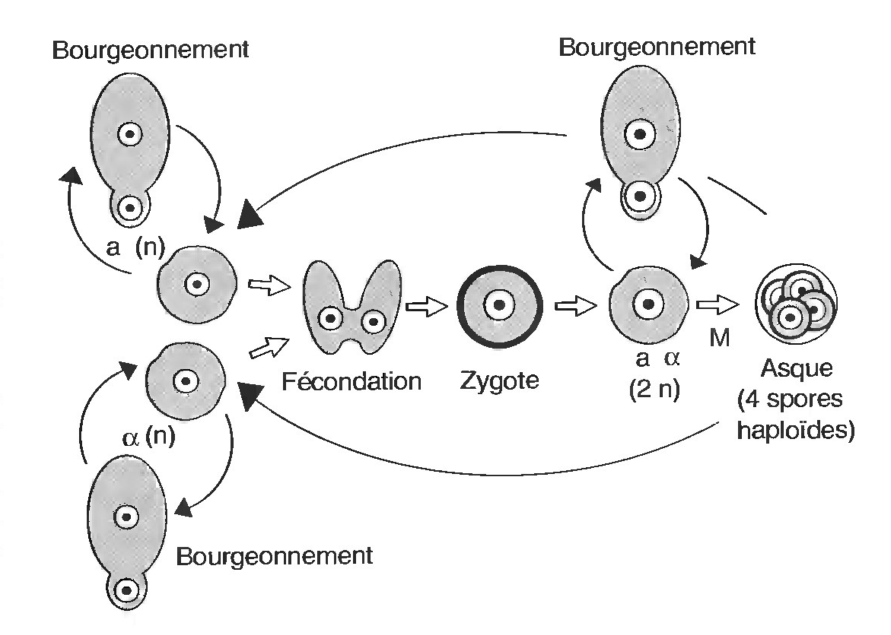


Fig. IX-1 : Cycle de développement d'une levure.
Ce champignon unicellulaire existe à l'état haploïde sous deux formes, a et α, qui peuvent se reproduire par bourgeonnement (mitose donnant naissance à deux cellules de taille inégale mais possédant le même équipement génétique). La fécondation ne peut se produire que par l'union d'une cellule a et d'une cellule α. Le zygote ainsi constitué, qui possède l'équipement génétique aα, est à l'origine de cellules diploïdes qui peuvent également se multiplier par bourgeonnement. Dans certaines conditions (voir p. 412) la méiose (M) est induite ; elle conduit à la formation d'un asque contenant quatre spores (deux a et deux α), chacune à l'origine d'une lignée de cellules haploïdes.

déterminées par les termes d'*haplophase* et de *diplophase*.

Comme le montre l'étude d'un organisme unicellulaire simple, une levure *(fig. IX-1)*, ce cycle, appelé **cycle de développement**, peut se compliquer par le fait que les cellules haploïdes et les cellules diploïdes sont souvent aptes à se multiplier par mitose, c'est-à-dire par reproduction conforme, si elles se trouvent dans un milieu favorable.

Chez les organismes pluricellulaires, animaux et végétaux, on retrouve l'alternance méiose-fécondation, mais les mitoses qui s'intercalent entre les deux points clefs du cycle donnent naissance à des associations cellulaires permanentes et complexes où les cellules sont différenciées en tissus. En fonction de l'importance plus ou moins grande de l'haplophase et de la diplophase, on peut distinguer plusieurs sortes de cycles de développement.

1. LES CYCLES DE DÉVELOPPEMENT

Les végétaux, et plus précisément les algues, présentent des cycles de développement caractéristiques. Ce sont ces organismes que nous utiliserons comme exemples.

1.1. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT À DEUX GÉNÉRATIONS D'ÉGALE IMPORTANCE

L'ulve est une petite algue verte, très commune sur nos côtes, dont l'appareil végétatif est constitué par une fine lame formée par deux couches cellulaires associées *(fig. IX-2)*.

Lorsque se produit la reproduction sexuée, certaines cellules situées au bord de la lame changent de couleur et se divisent. Chez certains individus *(fig. IX-2, A)*, chaque cellule subit 3 ou 4 divisions, formant ainsi 8 ou 16 cellules mobiles par deux flagelles : ce sont **les gamètes femelles**, g♀ ; ils sont libérés par l'ouverture de la cellule-mère. Chez d'autres individus *(fig. IX-2, B)*, le nombre de divisions dans les cellules marginales est plus élevé (4 ou 5) et 16 ou 32 gamètes sont formés ; également biflagellés et mobiles, ils sont de plus petite dimension que les précédents, ce sont les **gamètes mâles**, g♂.

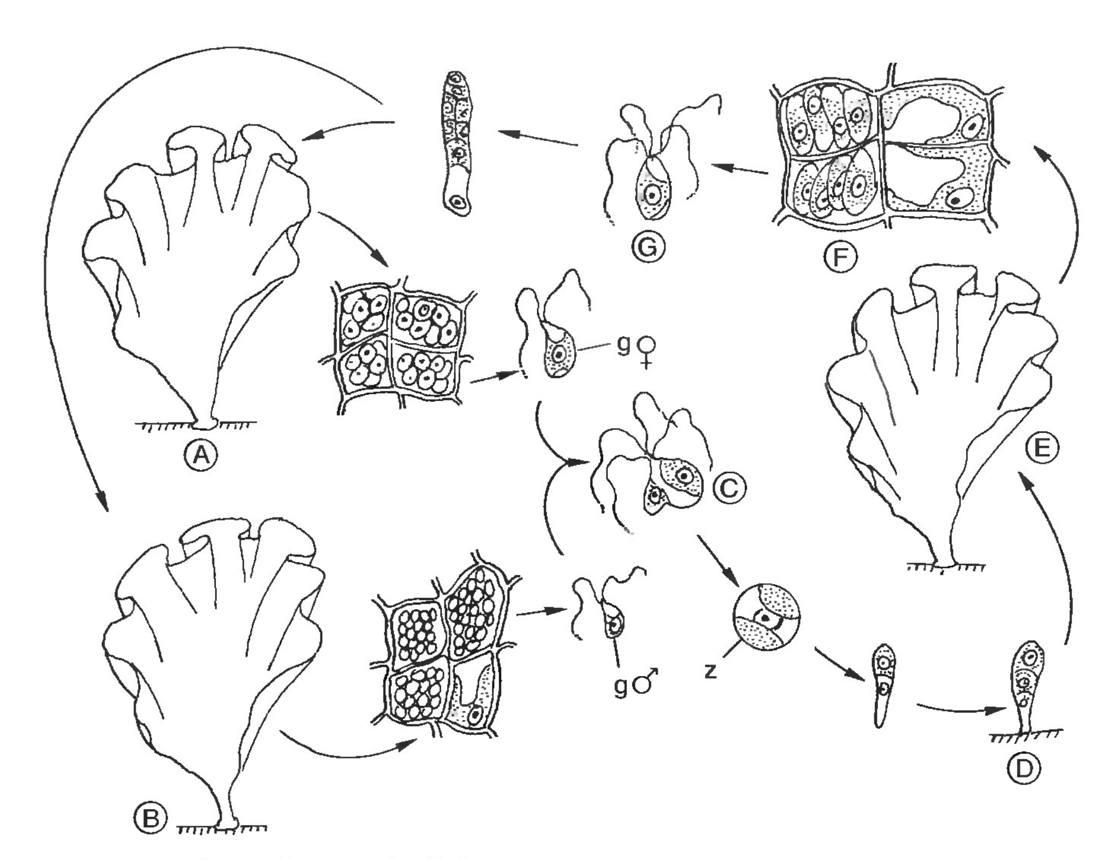


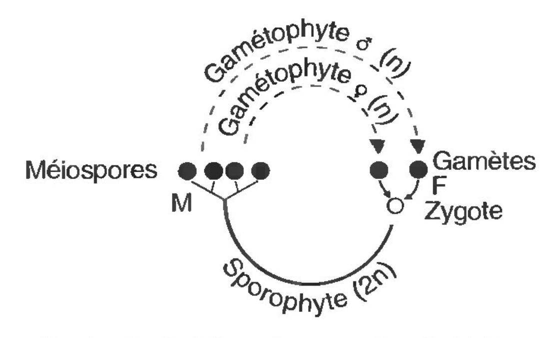
Fig. IX-2 : Reproduction d'une algue verte, l'ulve.

Les gamètes mâles et femelles se déplacent vers la surface de la couche d'eau où ils ont été libérés car ils sont attirés par la lumière. À ce niveau se produit la fécondation *(fig. IX-2, C)*. **L'œuf ou zygote** (z) pourvu de quatre flagelles nage quelque temps, puis s'oriente vers le fond où il se fixe donnant naissance à une algue tout à fait comparable aux précédentes *(fig. IX-2, D)*.

Le nouvel organisme ne forme jamais de gamètes *(fig. IX-2, E)*; les cellules marginales se divisent bien deux ou trois fois *(fig. IX-2, F)* et donnent naissance à des cellules mobiles par quatre flagelles *(fig. IX-2, G)*, ce sont des **spores**. Une fois libérées, ces cellules nagent quelque temps, puis se fixent ; elles sont à l'origine d'un nouvel individu qui produira soit des gamètes mâles, soit des gamètes femelles.

Le développement de cette algue est donc caractérisé par l'existence de deux générations d'égale importance, morphologiquement identiques : la première est formée par germination d'une spore, elle donne naissance aux gamètes, c'est **la génération gamétophytique,** *le gamétophyte* ; la seconde constituée à partir de l'œuf élabore deux types de spores, les unes donnant les gamétophytes mâles, les autres les gamétophytes femelles, c'est **la génération sporophytique,** *le sporophyte*. Le cycle de développement est donc à deux générations, il est ***digénétique***, d'égale importance, il est ***isomorphe***.

C'est au moment de la formation des spores que se situe le mécanisme compensateur de la fécondation, la méiose. Le sporophyte contient donc 2n chromosomes, c'est *la diplophase* ; le gamétophyte constitué à partir d'une spore ayant subi la méiose possède n chromosome, c'est *l'haplophase*.



Cycle digénétique isomorphe de l'ulve

1.2. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT MONOGÉNÉTIQUE DIPLOÏDE

C'est également une algue verte qui nous servira de modèle pour définir ce type de cycle, le *Codium,* dont l'appareil végétatif est formé par des ramifications cylindriques *(fig. IX-3, A et B)*, à structure cœnocytique (voir p. 168). Au moment de la reproduction sexuée, certaines de ces ramifications s'isolent par une cloison ; à l'intérieur du sac ainsi formé, les noyaux se multiplient et des cellules biflagellées s'organisent autour d'eux. Certaines ramifications (gam ♀) libèrent des cellules plus volumineuses correspondant aux gamètes femelles (gf) ; les autres (gam ♂) produisent des cellules de taille plus réduite, les gamètes mâles (gm) ; gamètes mâles et femelles sont produits sur des pieds différents *(fig. IX-3, A et B)*.

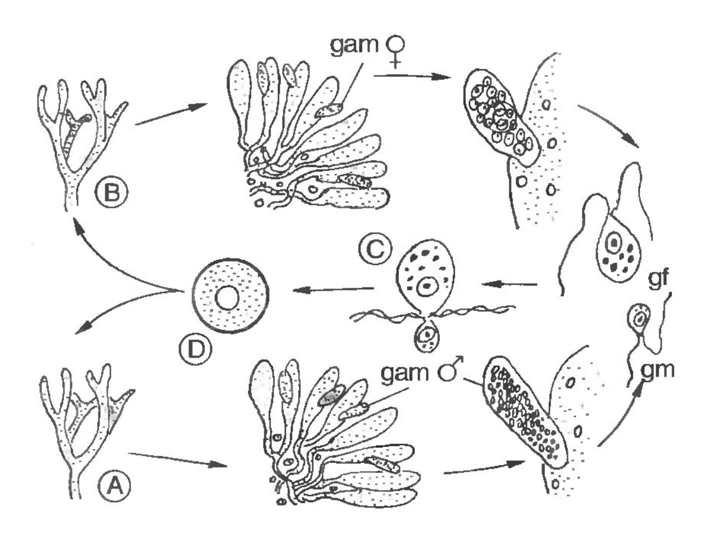
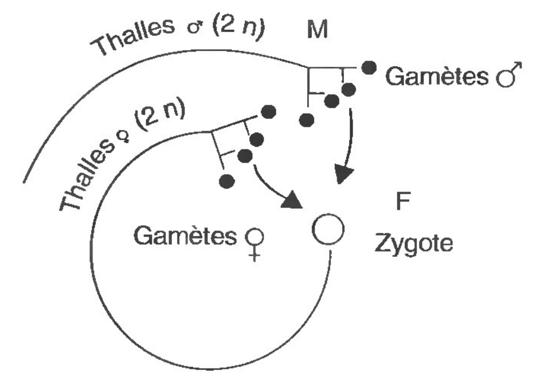


Fig. IX-3 : Reproduction d'une algue verte, le *Codium*.



Cycle monogénétique diploïde du *Codium*

La fécondation *(fig. IX-3, C)* forme un zygote *(fig. IX-3, D)*, qui s'immobilise et, en germant, donne naissance à un nouveau pied de *Codium*. La méiose se situe au moment de la formation des gamètes ; il n'y a pas de génération haploïde, le cycle est ***monogénétique diplophasique.***

1.3. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT MONOGÉNÉTIQUE HAPLOÏDE

C'est une petite algue verte unicellulaire d'eau douce, le *Chlamydomonas*, qui permettra d'illustrer ce type de cycle *(fig. IX-4)*.

Une cellule subit une série de divisions (A) ; à l'intérieur de la paroi de cette cellule-mère, 8, 16 ou 32 gamètes sont produits (B, C). Ils sont de taille identique mais pour que la fécondation puisse avoir lieu (D) il est nécessaire que chacun rencontre un gamète produit par une autre cellule de signe différent (+ ou –). Le zygote formé, possédant 4 flagelles, nage quelques instants (E) puis s'entoure d'une paroi épaisse et ornementée (F) qui lui permettra de résister à des conditions défavorables. Au moment de la germination, le noyau de ce zygote se divise par méiose (G), produisant quatre cellules haploïdes (H) qui sont comparables aux cellules-mères. La diplophase est limitée au zygote ; il n'y a pas de génération diploïde ; le cycle est **monogénétique haplophasique**.

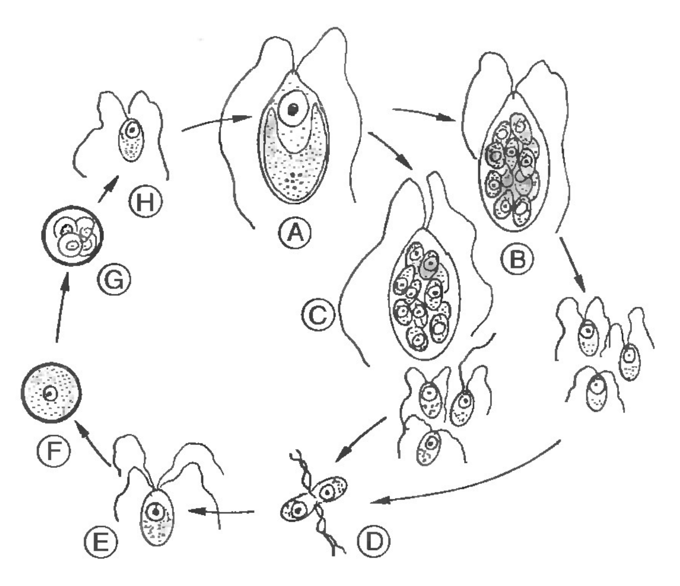
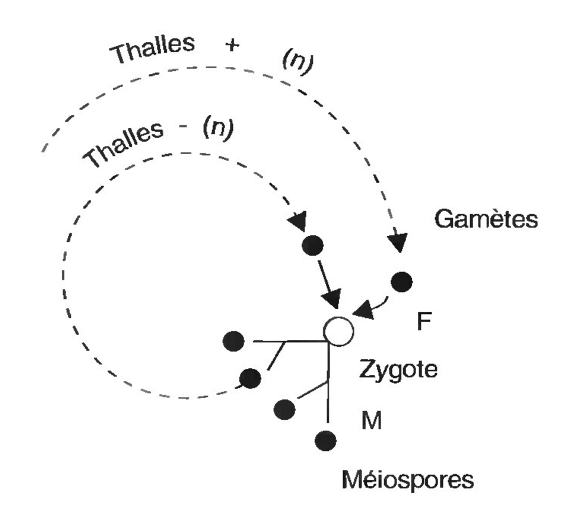


Fig. IX-4 : Reproduction d'une algue verte unicellulaire, le *Chlamydomonas*.



Cycle monogénétique haploïde du *Chlamydomonas*

Il existe donc trois principaux types de cycles définis par les positions respectives occupées par la fécondation et la méiose *. Chez les animaux, les organismes sont diploïdes et la méiose accompagne la formation des gamètes, précédant immédiatement leur différenciation, *la gamétogenèse*; il n'y a pas de génération haploïde. Chez les végétaux par contre, la situation est beaucoup plus diversifiée. Chez les formes inférieures, algues et champignons, on rencontre les trois types de cycles décrits; chez les formes supérieures, le cycle est typiquement digénétique, mais il est hétéromorphe, c'est-à-dire que l'une des générations est plus importante (taille, durée de vie...) que l'autre: chez les plus simples, les mousses, c'est l'haplophase qui domine; chez les plus évoluées (fougères, gymnospermes, angiospermes) c'est la diplophase. L'évolution observée chez les plantes supérieures est d'ailleurs significative puisqu'on observe une domination de plus en plus importante, des fougères aux plantes à fleurs, de la diplophase sur l'haplophase; cette dernière est extrêmement réduite chez les angiospermes, la situation réalisée étant alors très proche de celle rencontrée chez les animaux. Un double équipement chromosomique correspond vraisemblablement à un réel avantage; la prépondérance de la diplophase chez les organismes supérieurs en témoigne.

* Des cycles trigénétiques (où trois générations se succèdent) existent chez les algues rouges; leur étude n'est pas abordée ici.

Mitose et méiose sont donc des processus de division cellulaire qui aboutissent à la formation de deux cellules génétiquement identiques pour la première, de quatre cellules identiques deux à deux pour la seconde. Leur mise en œuvre pose deux problèmes: celui de la duplication du support de l'information génétique, c'est-à-dire de l'ADN, suivant un mécanisme qui se révèle être identique pour les deux modes de division; celui de la répartition des molécules dupliquées entre les cellules filles qui est réalisée de manière différente dans la mitose et dans la méiose.

2. LA DUPLICATION DU MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

C'est l'étape cruciale de la division cellulaire puisque les mécanismes mis en œuvre doivent permettre de constituer deux molécules rigoureusement identiques.

2.1. L'HYPOTHÈSE DE WATSON ET CRICK

Si l'on considère le modèle hélicoïdal proposé pour l'ADN par WATSON et CRICK (1953), trois modes de réplication peuvent être théoriquement envisagés *(fig. IX-5)*.

Dans le *mode conservatif*, l'ADN parental est entièrement conservé; les deux brins de la molécule fille sont néoformés.

Dans le *mode dispersif*, des fragments de l'ADN parental se répartissent entre les brins des deux molécules filles.

Dans le *mode semi-conservatif*, un brin de la molécule mère est conservé intégralement et sert de modèle pour la reconstitution du

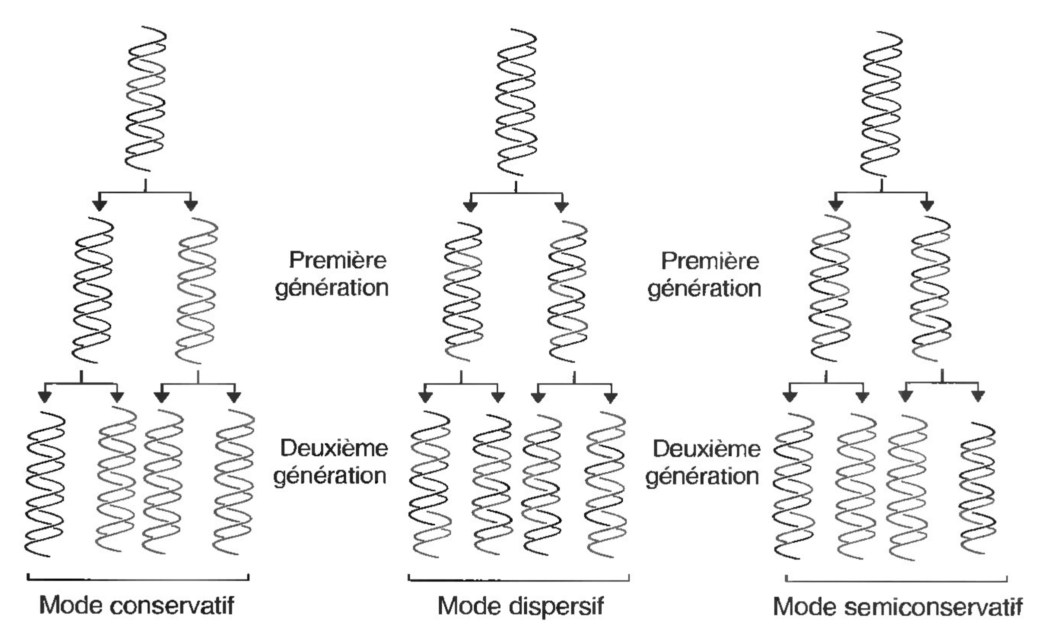


Fig. IX-5 : Modes théoriques de réplication de l'ADN.

second brin ; chaque molécule fille contient l'un des brins de la molécule d'origine.

WATSON et CRICK proposèrent le modèle semi-conservatif car il était le seul capable d'assurer convenablement la reproduction moléculaire en garantissant une rigoureuse transmission de l'information. Il fallut cependant attendre plusieurs années pour obtenir la vérification expérimentale de cette hypothèse.

2.2. VÉRIFICATION EXPÉRIMENTALE

Elle fut d'abord réalisée chez les Procaryotes, plus tardivement chez les Eucaryotes.

A. *Expérience de MESELSON et STAHL (1958)*

Pour distinguer l'ADN nouvellement formé de l'ancien, ces auteurs utilisèrent un isotope lourd, ***non radioactif***, de l'azote, le ^{15}N.

Des bactéries sont cultivées sur un milieu normal contenant du chlorure d'ammonium comme source d'azote ; les cellules sont isolées et l'ADN est extrait. Cet ADN est alors soumis à une centrifugation sur gradient de densité à l'équilibre. Le principe de la méthode est le suivant *(fig. IX-6, A)*.

L'ADN est mis en suspension dans un tube contenant une solution concentrée (6 moles) de chlorure de césium, CsCl ; la densité de cette solution est de 1,7. L'ensemble est centrifugé à vitesse rapide durant deux ou trois jours. Pendant cette période, les ions lourds de césium se déplacent lentement vers le fond du tube. En fin d'expérience, la tendance des ions à se mouvoir vers le fond est exactement compensée par leur tendance à se redistribuer par diffusion ; il y a *un gradient équilibré* : au sommet du tube, la densité en CsCl est de 1,6 ; au fond, elle est de 1,8 ; entre ces deux extrêmes on trouve, le long du tube, toutes les valeurs intermédiaires. Dans ce tube les molécules d'ADN se situent au niveau où la densité du milieu est identique à leur propre densité ; dans le cas présent, à l'équilibre, c'est celui où la densité est de 1,65 *(fig. IX-6, B)*. L'ADN peut être repéré aisément en lumière ultraviolette (UV), puisque les doubles liaisons conjuguées des bases absorbent fortement cette longueur d'onde ; ce repérage est réalisé pendant la centrifugation.

La même expérience est répétée avec de l'ADN extrait de bactéries ayant été cultivées pendant très longtemps sur un milieu où le chlorure d'ammonium est constitué avec de l'azote ^{15}N. À l'équilibre l'ADN est situé dans le tube au niveau correspondant à une

densité de 1,7 *(fig. IX-6, C)*. L'ADN de ces bactéries est donc plus lourd que celui des précédentes, ce que l'on comprend puisque les cellules ont effectué leurs synthèses, notamment celles des bases puriques et pyrimidiques, avec de l'azote ^{15}N ; les bases azotées étant très nombreuses, l'ADN à la constitution duquel elles participent est plus lourd.

L'expérience de MESELSON et STAHL a consisté à isoler des bactéries cultivées sur un milieu contenant exclusivement du ^{15}N et à les transférer dans un milieu ou seul de l'azote normal, ^{14}N, est disponible ; c'est l'instant t_0 *(fig. IX-6, C)*. À intervalles réguliers, des prélèvements effectués permettent d'isoler l'ADN et de déterminer, par centrifugation, l'évolution de la densité de cet acide nucléique. Si l'on considère un temps de génération de 30 minutes, c'est-à-dire un doublement de la population bactérienne toutes les

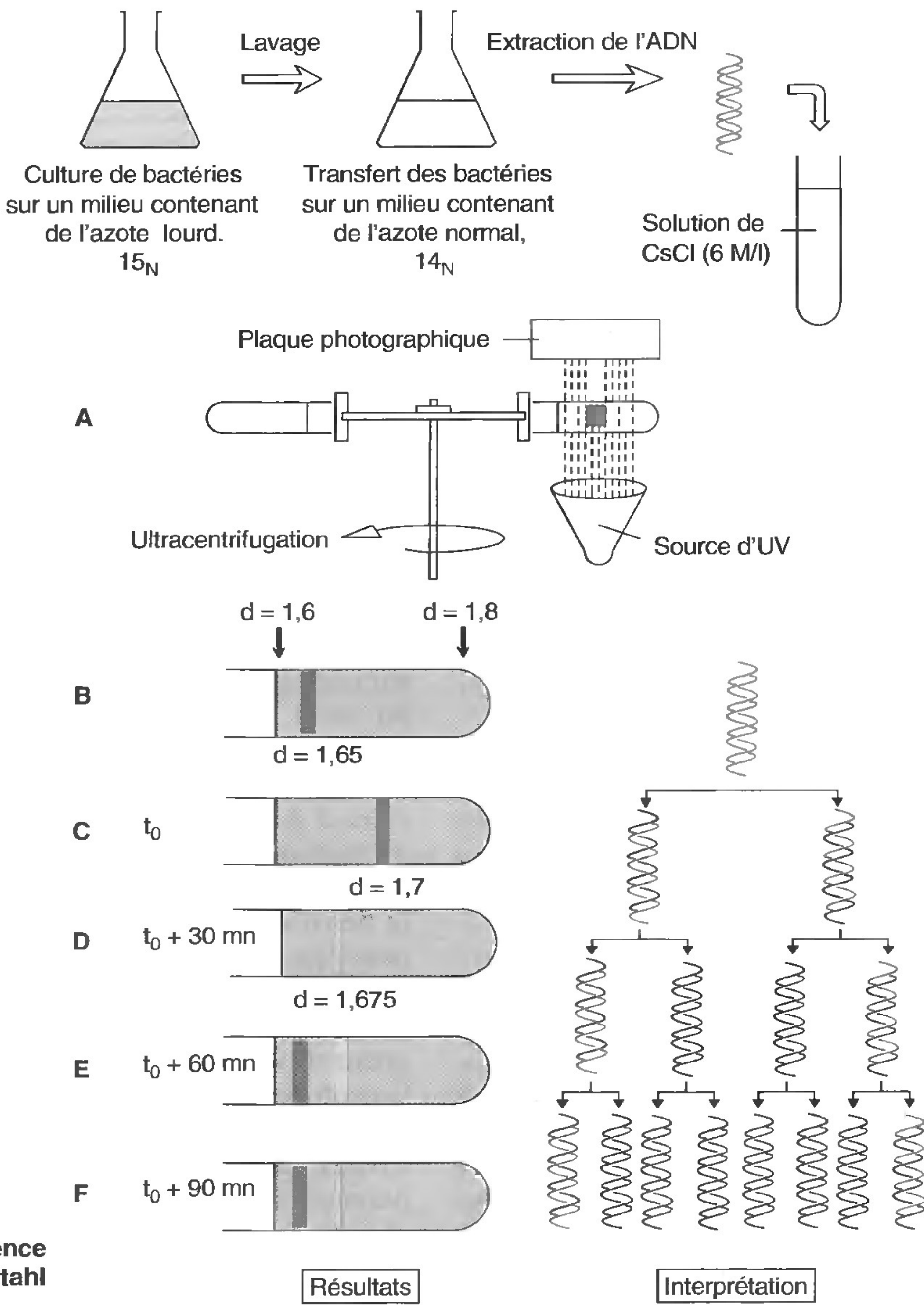


Fig. IX-6 : Expérience de Meselson et Stahl et interprétation.

30 minutes, les résultats obtenus sont les suivants.

À t_0 + 30 min, l'ADN se répartit en une seule bande de densité 1,675 *(fig. IX-6, D)*.

À t_0 + 60 min, l'ADN se répartit en deux bandes, l'une a une densité de 1,675, l'autre de 1,650 *(fig. IX-6, E)*.

À t_0 + 90 min, l'ADN se répartit toujours en deux bandes mais d'importance inégale, l'une a une densité de 1,675, l'autre, abondante, de 1,650 *(fig. IX-6, F)*.

Le fait que la bande dont la densité est de 1,7, correspondant à l'ADN formé uniquement avec de l'azote ^{15}N, disparaisse dès la première génération exclut d'emblée l'hypothèse d'une réplication selon le mode conservatif. Dans celui-ci en effet, la molécule d'origine est toujours présente.

Pour trancher entre les deux autres modes, semi-conservatif et dispersif, il faut attendre la deuxième génération ; à ce moment il réapparaît de l'ADN constitué uniquement avec l'azote ^{14}N ; le modèle semi-conservatif est par conséquent le seul permettant d'expliquer ces résultats.

B. Expérience de TAYLOR (1963)

Ces expériences furent conduites sur des racines de *Bellevalia*, plante qui présente l'intérêt d'avoir des cellules se divisant à intervalles réguliers.

Dans une première expérience, les cellules furent marquées par de la ^3H thymidine ajoutée au milieu de culture aussitôt terminé un cycle de division cellulaire *(fig. IX-7, A)*. Peu avant la division suivante, les racines sont traitées par un alcaloïde, la colchicine qui empêche la séparation des chromosomes fils en anaphase. Des préparations de ces chromo-

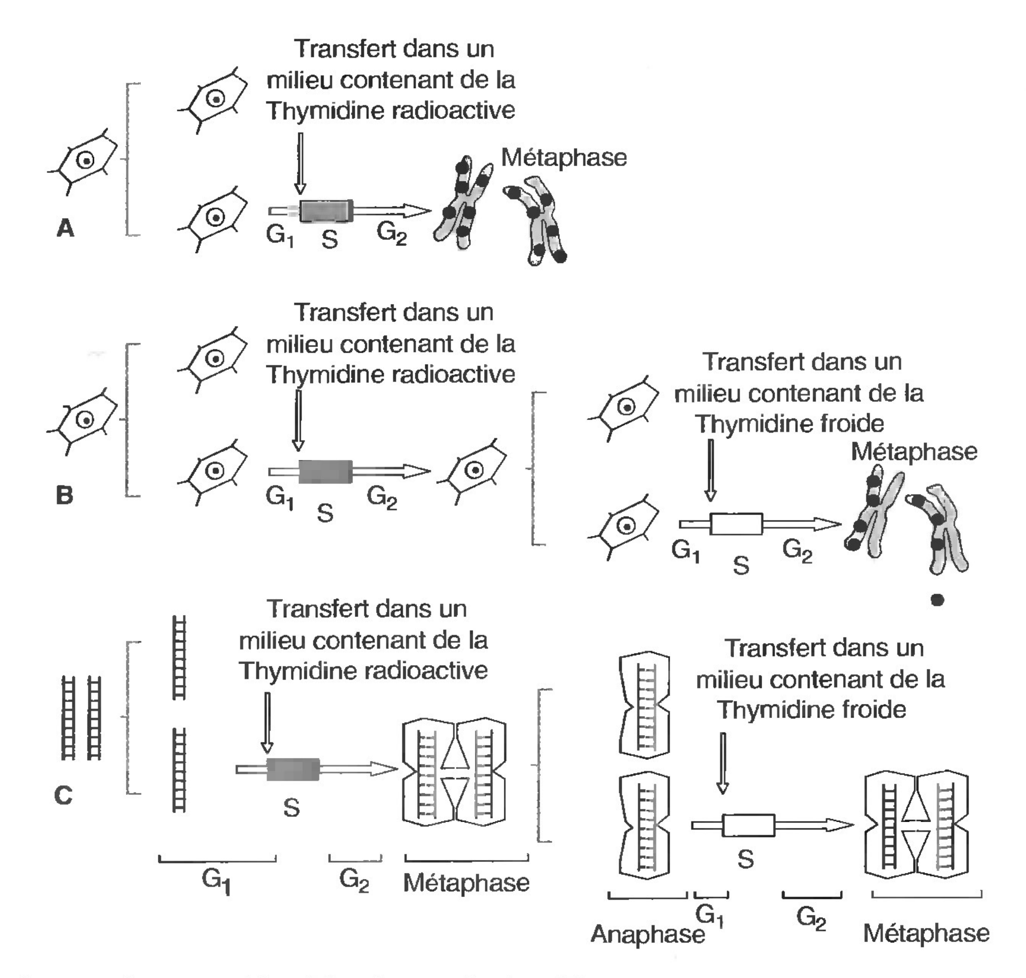


Fig. IX-7 : Expérience de Taylor (A et B) et interprétation (C).
En C, l'ADN néoformé radioactif est représenté en rouge.

somes sont alors réalisées ; chaque chromosome est constitué par l'association des deux chromatides. Par autoradiographie il est possible de montrer que chacune de ces chromatides contient des atomes de tritium radioactif, les grains d'argent étant également répartis au-dessus de l'une et de l'autre.

Dans une seconde expérience, les racines traitées par la ^{3}H thymidine à la fin d'un premier cycle de division ne sont pas préparées pour les observations au début du second cycle ; à ce moment, elles sont simplement transférées, après un lavage soigneux éliminant le précurseur soluble, dans un milieu contenant de la thymidine froide *(fig. IX-7, B)*. C'est au début de la troisième division qu'interviennent le traitement par la colchicine, la préparation des chromosomes et l'autoradiographie. On note alors que seule l'une des deux chromatides de chaque chromosome est radioactive, celle au-dessus de laquelle on peut observer les grains d'argent.

La réalisation de schémas où sont figurés les deux brins de la molécule d'ADN constituant une chromatide permet de comprendre pourquoi cette expérience démontre la réalité d'une réplication semi-conservative *(fig. IX-7, C)*.

Chez les Procaryotes comme chez les Eucaryotes, la réplication est donc semi-conservative, ce qui impose, au niveau moléculaire, un certain nombre de contraintes.

2.3. LA RÉPLICATION DE L'ADN

Puisque le processus est semi-conservatif, on peut d'emblée supposer que la synthèse d'une nouvelle molécule est réalisée par copie d'un brin de la molécule d'origine, *le brin matrice*. Le processus n'est donc pas fondamentalement différent de celui mis en œuvre pour réaliser la transcription. Deux points compliquent toutefois le mécanisme : les deux brins de la molécule d'origine doivent être copiés simultanément ; la copie doit être rigoureusement fidèle puisqu'il ne s'agit plus de synthétiser un *intermédiaire à durée de vie courte, mais un nouveau support d'information, qui servira à son tour de matrice pour de nouvelles réplications.* La moindre erreur, le moindre changement de nucléotide, peut donc avoir des conséquences extrêmement importantes. La modification d'une seule base modifie en effet le triplet codant et peut conduire à l'insertion dans un polypeptide d'un aminoacide différent ; nous avons vu à propos de l'hémoglobine (p. 43) combien les conséquences pouvaient en être importantes.

A. ADN polymérases et synthèse du polynucléotide

L'enzyme susceptible d'enchaîner les désoxyribonucléotides est une ADN polymérase ; la première fut isolée par KORNBERG en 1956.

Le principe de la réplication *(fig. IX-8)* est dans ses grandes lignes le même que celui de la transcription.

– L'addition d'un nouveau désoxynucléotide est une *estérification*, réaction endergonique qui implique un apport énergétique ; celui-ci est fourni par le monomère lui-même qui est toujours un *désoxyribonucléoside 5'*

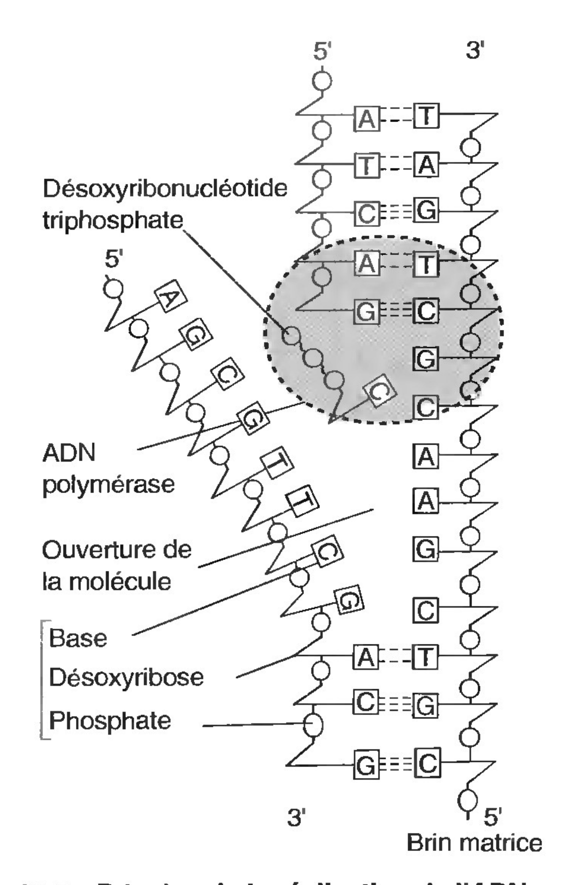


Fig. IX-8 : Principe de la réplication de l'ADN.

triphosphate et la mise en place du nucléotide s'accompagne de la libération d'un groupe pyrophosphate (Pi~Pi).

– La fixation du nouveau nucléotide s'effectue toujours à *l'extrémité 3'OH du polynucléotide en cours d'élongation* ; on ne connaît pas d'ADN polymérase capable d'effectuer une addition en 5' dans les conditions naturelles.

– Le nouveau brin synthétisé est complémentaire du brin matrice; il y a appariement des bases en respectant les possibilités d'établissement des liaisons hydrogène, c'est-à-dire formation des couples A-T et C-G.

– La synthèse est effectuée dans le sens d'une progression de 5' vers 3'; la lecture du brin matrice a donc lieu de 3' vers 5'.

L'ADN polymérase reconnaît la base sur le brin lu, présente le désoxyribonucléotide complémentaire et catalyse l'estérification. Cette molécule présente toutefois, dans son fonctionnement, une particularité qui va compliquer singulièrement le processus de la réplication. Non seulement elle est incapable d'enchaîner les nucléotides en l'absence du brin d'ADN servant de matrice, mais ***elle ne peut pas positionner un premier nucléotide***. En d'autres termes, il faut pour que cette enzyme soit active qu'elle dispose d'un brin matrice et d'un brin amorce qui fournira une extrémité 3'OH libre à partir de laquelle sera réalisée l'estérification : *elle ne peut pas initier la synthèse d'un nouveau brin d'ADN (fig. IX-9).*

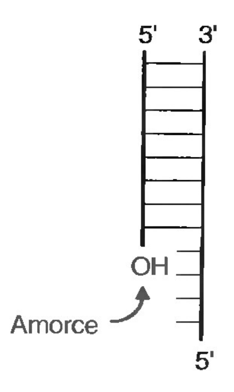


Fig. IX-9 : Brin matrice et brin amorce.

B. Dans quel sens la duplication évolue-t-elle ?

On peut mettre en évidence la progression de la synthèse en fournissant à des cellules en culture, des colibacilles par exemple, un précurseur radioactif. Comme nous l'avons déjà vu, le choix de celui-ci est déterminant si l'on désire obtenir un marquage spécifique. Pour marquer l'ADN il convient, bien entendu, de choisir le nucléotide construit avec la thymine, base caractéristique de cet acide nucléique, c'est-à-dire *la désoxythymidine tritiée.*

Le protocole expérimental est le suivant.

On fournit à des cellules en culture de la thymidine radioactive à faible activité, c'est-à-dire où seulement quelques molécules de thymidine sont porteuses d'un atome de tritium. Au temps t_0 de l'expérience on ajoute au milieu de la thymidine radioactive à *haute activité spécifique*, c'est-à-dire où pratiquement chaque nucléotide contient un atome de tritium.

Après une dizaine de minutes, les cellules sont refroidies brusquement, traitées par le lysozyme pour réaliser un étalement moléculaire suivi d'une autoradiographie comme cela avait été fait dans l'expérience décrite page 161.

Le nucléoïde est détecté dans l'émulsion qui recouvre l'étalement par une radioactivité relativement faible; par contre au niveau des zones *qui étaient en cours de réplication pendant la courte période de contact avec la thymidine tritiée à haute activité, les grains d'argent sont beaucoup plus nombreux.* Certains nucléoïdes apparaissent ouverts localement, formant un œil de réplication ; il convient de noter que, dans certains cas à ce niveau, la partie médiane de l'ouverture est faiblement marquée, alors que les extrémités, les fourches, le sont intensément; c'est à cet endroit que la thymidine tritiée à haute activité spécifique a été incorporée *(fig. IX-10)*. La conclusion qui s'impose est que la progression des nouvelles molécules d'ADN est symétrique, elle progresse de part et d'autre d'un point d'origine ; ***elle est bidirectionnelle***.

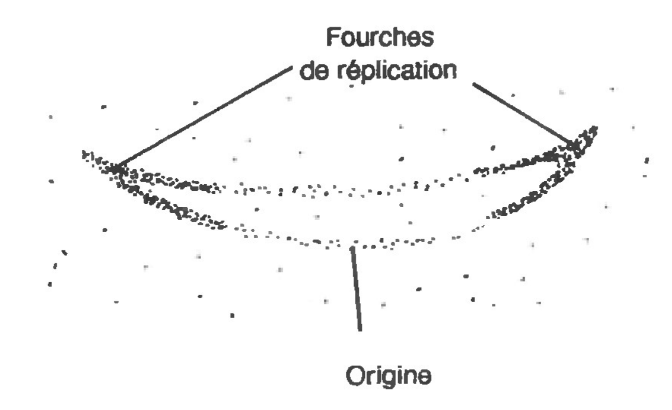


Fig. IX-10 : Œil de réplication.

C. La progression bidirectionnelle

L'ADN polymérase qui assure la réplication, *l'ADN polymérase III*, ne pouvant synthétiser un polynucléotide que dans le sens d'une progression 5' vers 3', la molécule d'ADN devrait être complètement ouverte pour que les deux brins-fils, antiparallèles, soient élaborés simultanément. Cette situation est incompatible avec ce que nous savons de l'organisation de la molécule d'ADN ; sa forme thermodynamiquement la plus stable est en effet la double hélice.

Nous avons vu cependant que la progression au niveau d'un œil de réplication est toujours bidirectionnelle. Ces données supposent une ouverture de la molécule, la fixation des polymérases et le début de synthèse de part et d'autre du point d'ouverture sur les deux brins à la fois, aussi bien dans le sens d'une lecture 5' vers 3' que dans celui d'une lecture 3' vers 5'.

En fait on a découvert que la réplication s'accompagne toujours de la synthèse d'une très faible quantité d'ARN, ce que l'on peut mettre en évidence en fournissant aux cellules le précurseur spécifique l'uridine tritiée. Or nous avons vu, en étudiant la transcription, que si l'ADN polymérase ne peut pas positionner un premier nucléotide complémentaire d'un brin d'ADN, ***l'ARN polymérase le peut*** *(fig. IX-11)*. Cette enzyme après avoir mis en place quelques nucléotides est alors éliminée ; l'ARN formé laisse cependant une extrémité 3'OH libre sur laquelle l'ADN polymérase III peut estérifier un désoxyribonucléotide. Le fonctionnement de l'ADN polymérase implique donc la mise en place préalable d'un court fragment d'ARN (une dizaine de nucléotides) par *une ARN polymérase qui prend le nom de* ***primase***.

L'intervention de cette primase permet de comprendre comment peut être initiée la synthèse d'ADN, il n'explique pas la synthèse bidirectionnelle. En effet, la croissance du polynucléotide complémentaire accroché à l'ARN amorce est possible et se produit dans le sens de progression 5' → 3' ; elle ne peut pas se réaliser dans le sens 3' → 5' avec l'ADN polymérase.

La fourniture de thymidine tritiée haute activité, pendant quelques secondes, à des cellules en cours de réplication révèle l'existence de deux catégories de molécules radioactives parmi l'ADN que l'on peut isoler : des polynucléotides très longs et des polynucléotides courts, constitués par 1 000 à 2 000 nucléotides chez les bactéries, que l'on a nommé ***fragments d'OKAZAKI***, du nom du biochimiste qui les mit en évidence.

Ces fragments courts correspondent à des molécules synthétisées dans le sens normal 5' → 3', mais à « ***contre courant*** » *si l'on considère la progression de la fourche de réplication.*

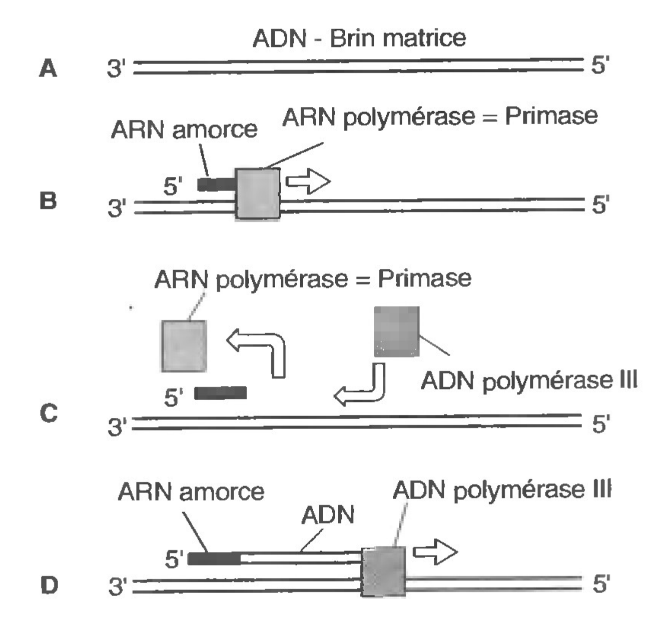


Fig. IX-11 : Initiation de la réplication.

D. Le mécanisme moléculaire de la réplication *(fig. IX-12)*

La réplication commence en un point particulier de la molécule d'ADN, le site d'origine, qui correspond chez les bactéries à une séquence particulière d'environ 250 nucléotides. Ce point d'origine est reconnu par des protéines qui viennent s'y fixer, ce sont les *protéines initiatrices* (A).

Ces protéines se lient à une molécule d'ADN dont l'organisation en double hélice est particulièrement stable ; l'ouverture de cette hélice nécessite une énergie importante ; il faut en effet se souvenir que la dénaturation thermique de l'ADN se situe entre 75 °C et 110 °C. Dans les conditions de la réplication, ce sont des enzymes particulières qui vont abaisser le niveau d'énergie nécessaire ; on les nomme *hélicases* ou *déroulases* (A, B). Elles se fixent sur les protéines initiatrices et, en hydrolysant de l'ATP, séparent localement les deux brins de la molécule d'ADN.

Au niveau de cette ouverture, viennent alors se fixer deux primases, une sur chaque brin, qui commencent à élaborer une molécule d'ARN complémentaire du brin d'ADN, ***c'est l'ARN amorce*** (C, D). Ces ARN polymérases, qui progressent dans le sens 5' → 3', sont très rapidement éliminées et remplacées par des ADN polymérases III qui accrochent les premiers désoxynucléotides aux extrémités 3'OH des amorces (D, E).

La progression des ADN polymérases implique une ouverture de plus en plus importante de part et d'autre du site d'origine ; la formation de ces fourches de réplication est due à la poursuite de l'activité des hélicases. Cette progression bilatérale a deux conséquences importantes :

– D'abord la progression des hélicases crée au niveau de la molécule d'ADN des contraintes importantes. Pour pouvoir dérouler la molécule, il faudrait que celle-ci puisse tourner librement, comme le fait un morceau de ficelle dont on cherche à séparer les deux brins constitutifs en tirant sur les extrémités. Cette situation n'est pas envisageable dans la cellule. Pour éviter cette rotation, il y a, *en amont des hélicases*, des enzymes particulières, non figurées sur le schéma, des *topoisomérases*, qui coupent localement l'un ou les deux brins d'ADN, permettant leur rotation l'un autour de l'autre ; elles éliminent ainsi les contraintes créées par la progression des hélicases ; elles referment ensuite la molécule.

– La progression des ADN polymérases n'étant possible que dans le sens d'une synthèse 5' → 3', seul le brin lu dans le sens 3' → 5' est réassocié en molécule double brin. L'autre brin se trouve être seul, situation instable qui pourrait aboutir à la formation locale de boucles en épingles à cheveux qui interdiraient toute synthèse complémentaire ultérieure. Pour éviter cette situation, des protéines particulières, *déstabilisatrices* *, viennent s'associer temporairement à cet ADN monocaténaire (E).

Lorsque l'ouverture de l'ADN parental atteint une certaine importance, une primase vient se fixer à l'ADN monocaténaire ; elle forme un ARN amorce court (F) puis est remplacée par l'ADN polymérase III qui, pouvant progresser dans le sens 5' → 3', forme le brin d'ADN complémentaire (G). La progression de cette dernière enzyme cesse lorsqu'elle rencontre l'ARN formé au moment de l'ouverture du site d'initiation, celui qui sert d'amorce pour le brin synthétisé en continu. Le court désoxypolynucléotide qui a été ainsi mis en place est un fragment d'OKAZAKI.

La progression continue des hélicases libérant un nouveau segment d'ADN monocaténaire, le phénomène peut se reproduire en avant du précédent et mettre en place un nouveau fragment d'OKAZAKI (H).

Ainsi des deux côtés du site d'origine, il y a un brin complémentaire qui est synthétisé de manière continue et un autre de manière discontinue, par fragments successifs ; ***la progression des fourches est bien bidirectionnelle, mais la synthèse de l'ADN est toujours unidirectionnelle*** puisque les ADN polymérases progressent toujours dans le sens 5' → 3'.

---

* Car elles interdisent à la molécule d'ADN une situation stable obtenue en se reployant sur elle-même pour former une double hélice monocaténaire.

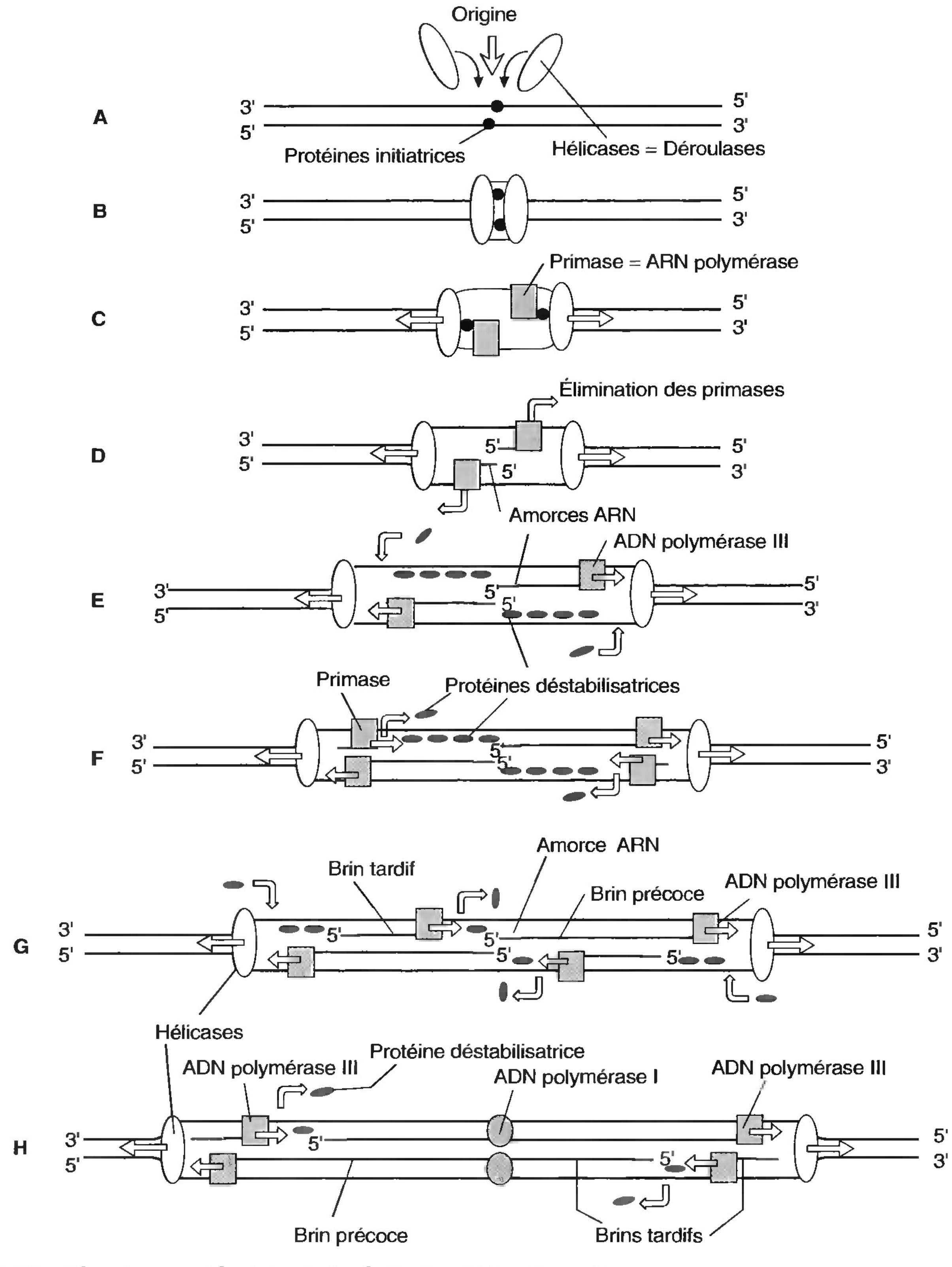


Fig. IX-12 : Mécanisme moléculaire de la réplication bidirectionnelle.

Il existe bien entendu un léger décalage de temps entre la synthèse des deux sortes de brins ; celui qui est synthétisé en continu est formé le premier, c'est *le brin précoce*, celui édifié de manière discontinue l'est avec un léger retard, c'est *le brin tardif*.

Sur cette molécule double brin ainsi mise en place persistent de courts fragments d'ARN.

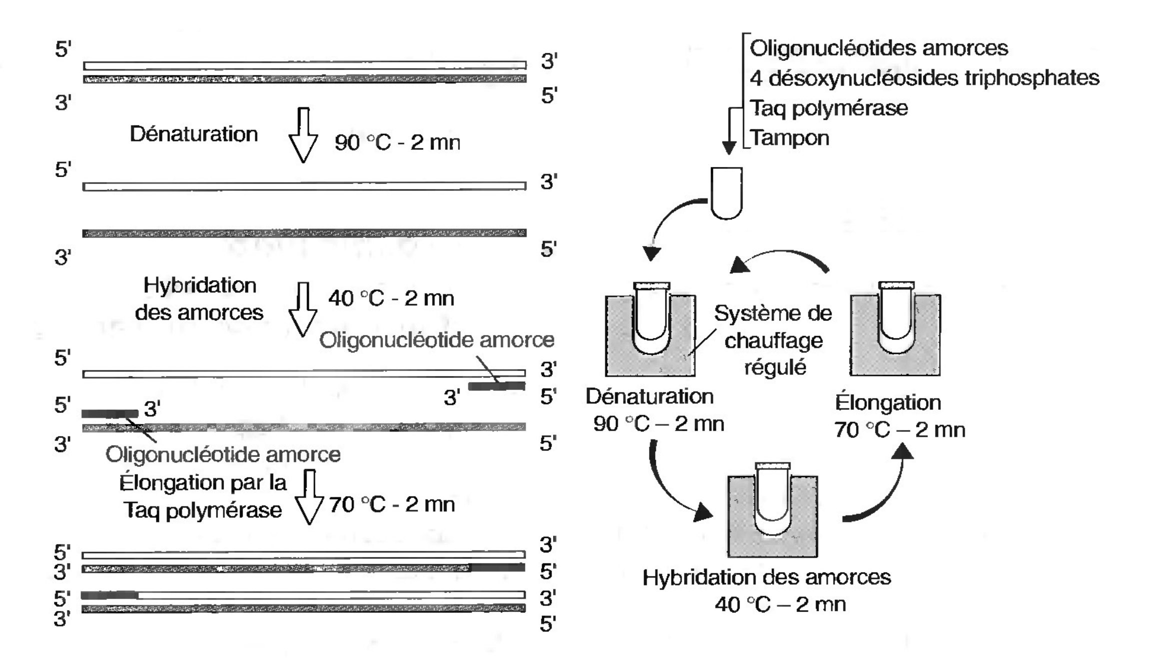
L'AMPLIFICATION *IN VITRO* DE SÉQUENCES D'ADN OU PCR *(POLYMERASE CHAIN REACTION)*

Cette technique, mise au point en 1985, permet d'amplifier spécifiquement, *in vitro*, un segment d'ADN dans la mesure où la séquence est connue, tout au moins celle de ses extrémités 3'. En effet, il faut nécessairement synthétiser deux désoxyribonucléotides complémentaires des extrémités 3' du fragment moléculaire à amplifier. Ces polydésoxyribonucléotides, constitués chacun par une vingtaine de nucléotides, sont *les amorces*.

L'amplification est réalisée en trois étapes: *dénaturation de l'ADN*, c'est-à-dire séparation des deux brins par élévation de la température du milieu à 90 °C; *hybridation avec les deux amorces* réalisée à température plus basse, 40 °C par exemple; *extension des amorces et synthèse 3'→ 5'* des brins complémentaires par une ADN polymérase en présence des quatre désoxyribonucléosides triphosphate; dénaturation, hybridation et extension constituent un cycle. Lorsque la synthèse est terminée, un nouveau cycle peut être initié; l'amplification est donc exponentielle, au bout de n cycles on obtient 2^n exemplaires du segment d'ADN.

La méthode est essentiellement fondée sur des variations thermiques. Elle a connu un essor considérable à partir de 1988, lorsque fut isolée, à partir d'une bactérie vivant dans les sources hydrothermales, *Thermus aquaticus*, une ADN polymérase résistant aux températures élevées, notamment aux 90 °C nécessaires à la dénaturation.

Cette enzyme, baptisée *Taq polymérase*, a permis de réaliser l'amplification en continu puisque l'enzyme n'est pas dénaturée et n'a donc pas à être remplacée à chaque cycle; le fragment d'ADN à amplifier, la Taq polymérase, les amorces, les quatre désoxyribonucléotides, en solution dans un tampon, sont placés dans un tube qui est soumis aux variations thermiques cycliques: dénaturation à 90 °C → hybridation à 40 °C → élongation à 70 °C → dénaturation à 90 °C... Ces variations thermiques peuvent être programmées et des appareils ont été mis au point qui permettent l'automatisation du processus (cycleurs).



Une vingtaine de cycles sont généralement réalisés et on obtient ainsi 2^{20} segments d'ADN rigoureusement identiques; c'est un véritable ***clonage acellulaire*** d'autant plus intéressant que le matériel de départ peut être extrêmement réduit (100 ng d'ADN). Elle peut être réalisée à partir de matériel frais (tissus biologiques, sang) ou sec (taches de sang, de sperme), voire de fossiles ou de momies. Elle est actuellement très utilisée car elle permet, entre autres, l'obtention d'un matériel suffisamment abondant pour réaliser le séquençage des molécules (gènes par exemple), la production de sondes spécifiques en grandes quantités, la recherche de mutations ponctuelles, la détection de particules virales chez un organisme (HIV, notamment), l'identification de traces d'intérêt médicolégal dont l'origine peut être attribuée, par comparaison, à un individu précis (empreintes génétiques). Les limites de la technique sont la taille du fragment à amplifier, qui ne doit pas être supérieur à 3 kb, et le nombre de copies (20 à 30 cycles). Notons enfin que la sensibilité de la méthode est telle que les risques d'amplifications parasites (ADN étranger accidentellement associé à celui qui doit être amplifié) sont considérables; les manipulations doivent être réalisées dans des conditions extrêmement précises dans des laboratoires spécialisés.

Ceux-ci sont très rapidement remplacés par une ADN polymérase particulière, l'ADN polymérase I (H), qui remplace chaque ribonucléotide par un désoxyribonucléotide, en respectant la complémentarité avec le brin d'ADN parental *(fig. IX-13)*. Une dernière enzyme intervient ensuite, elle assure la liaison phosphodiester entre les brins d'ADN formant les fragments d'OKAZAKI, c'est une ADN ligase.

Lorsque ces enzymes sont toutes intervenues, il y a de part et d'autre du site d'origine deux molécules bicaténaire identiques.

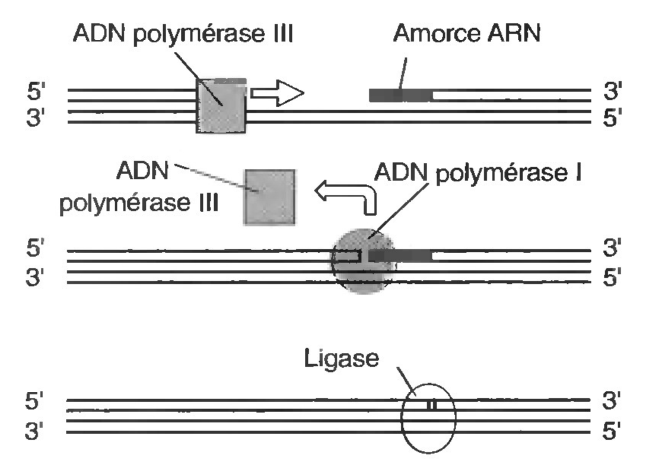


Fig. IX-13 : Assemblage des fragments d'Okazaki.

E. La correction des erreurs

L'ADN polymérase enchaîne les nucléotides complémentaires du brin matrice avec une fidélité remarquable. Nous avons déjà signalé que le moindre changement de nucléotide pouvait avoir des conséquences importantes puisqu'il peut être à l'origine d'une mutation.

Les erreurs dans la réplication se produisent, bien entendu, avec une fréquence que l'on peut estimer à un changement de base tous les 10^4 nucléotides. Bien qu'il soit extrêmement faible, ce taux est intolérable si l'on considère que la longueur moyenne d'un gène se situe autour de 10^3 nucléotides. À chaque réplication un nombre important de gènes serait modifié, ce qui conduirait au bout de quelques générations à une transformation complète du génome et donc des espèces.

En réalité ce taux est beaucoup plus faible car *la plupart des erreurs sont corrigées*. Le principe de cette correction est le suivant. Le mauvais appariement d'une base ne permet pas l'établissement des liaisons normales entre les deux polynucléotides, le brin matrice et le brin en formation, ce qui a pour conséquence de mal positionner le groupement 3'OH qui doit intervenir dans l'estérification suivante; cette réaction ne peut pas avoir lieu et la synthèse est arrêtée. Une correction est alors effectuée, le nucléotide mal positionné est excisé, ce qui permet de redémarrer, un nucléotide en amont, le processus de réplication.

Chez les Procaryotes, c'est l'ADN polymérase elle-même qui effectue la correction car cette enzyme possède *une action exonucléasique* fonctionnant dans le sens 3' → 5'. Chez les Eucaryotes on pense que c'est une autre enzyme, associée au complexe de réplication, qui est responsable de la réparation.

Dans les deux cas, il s'agit d'***une autocorrection*** de très grande importance si l'on considère la pérennité du matériel génétique.

F. Organisation macromoléculaire d'une fourche de réplication

La réplication de l'ADN nécessite au niveau de chaque fourche l'intervention dans un ordre parfaitement déterminé d'une succession d'enzymes.

Par des méthodes d'extraction particulièrement douces il a été possible d'isoler, à partir d'organismes aussi variés que les drosophiles, les levures ou les mammifères, de volumineux complexes macromoléculaires (dont la taille estimée est de 1000 kDa), que l'on a appelés *réplisomes* ou *réplicases*.

À leur niveau, on a pu mettre en évidence les ADN polymérases, les primases, les topoisomérases, les hélicases, des exonucléases. Dans ces volumineux complexes, l'ADN subirait un trajet complexe que l'on peut essayer de représenter sous une forme simplifiée *(fig. IX-14)*. Le mouvement de l'ADN dans ces volumineux complexes est dû aux enzymes elles-mêmes, les ADN polymérases,

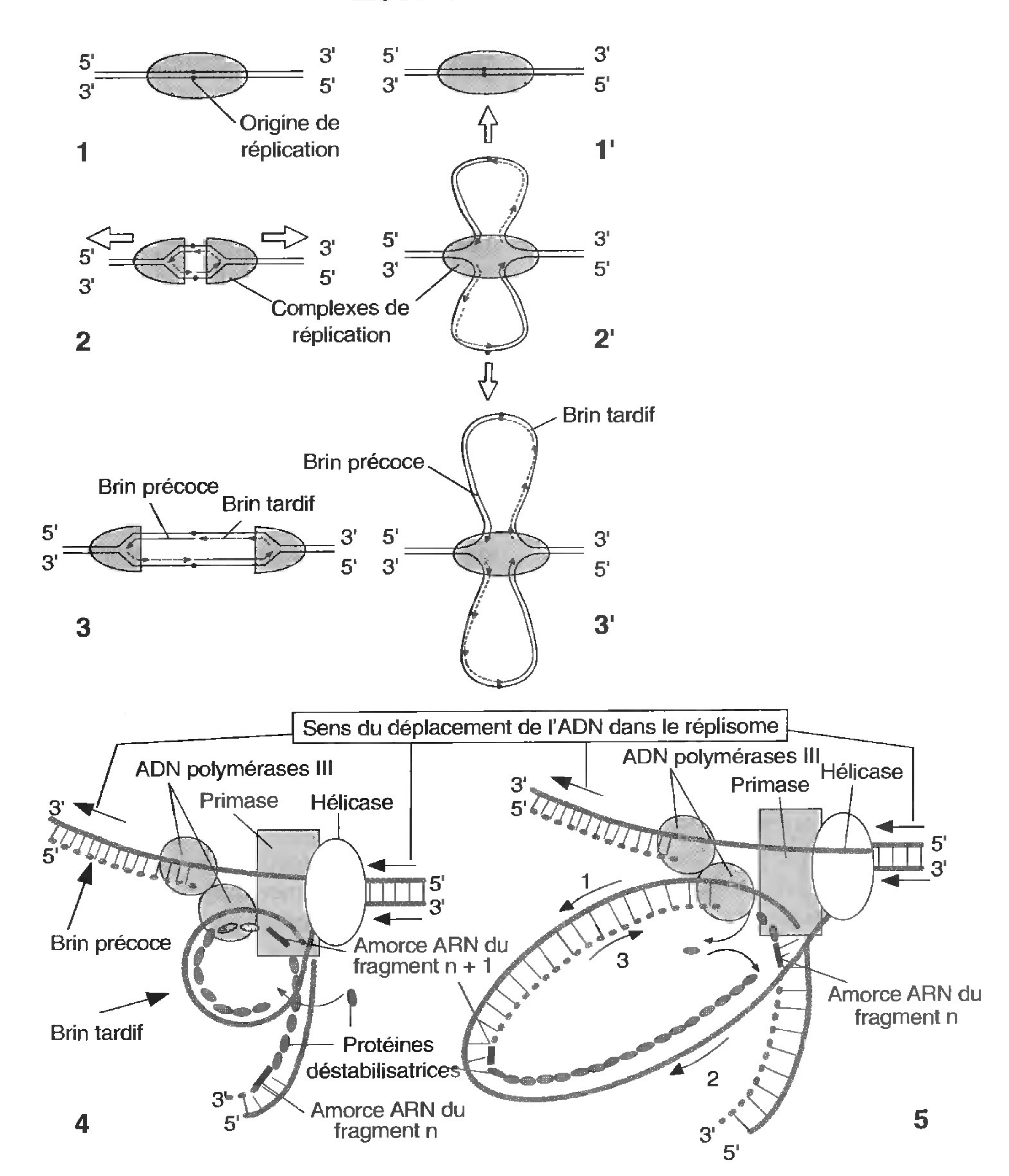


Fig. IX-14: Organisation schématique d'un réplisome.

1 à 3) Les complexes de réplication ou réplisomes sont de volumineux ensembles plurienzymatiques dont le mode de fonctionnement peut être envisagé selon deux modèles. Dans le premier, ce sont les complexes qui, après s'être fixés à l'origine de réplication, se séparent et se déplacent sur la molécule d'ADN (1, 2, 3); dans le second (1', 2', 3'), qui semble être actuellement le plus vraisemblable, la molécule pénètre dans les complexes qui demeurent immobiles.

4) Dans le réplisome, le brin précoce et le brin tardif pénètrent et sont séparés par les hélicases. La duplication du brin précoce est immédiatement assurée par l'ADN polymérase III; sur le brin tardif, pour lequel la réplication est différée, des protéines déstabilisatrices sont positionnées, évitant son reploiement en hélice monocaténaire; la boucle formée par ce brin est serrée et la primase dépose l'ARN amorce n + 1; lorsque celle-ci sera positionnée, l'ADN polymérase III enchaînera des désoxyribonucléotides dans le sens d'une progression 5' → 3'.

5) La synthèse 5' → 3' du brin tardif à partir de l'amorce ARN n + 1 (flèche n° 3) fait revenir le brin matrice en arrière (flèche n° 1); les deux extrémités de ce polynucléotide progressent alors dans le même sens (flèches 1 et 2), la boucle formée augmente d'importance. Lorsque l'ADN néosynthétisé rejoint l'amorce du fragment d'Okazaki précédent (n), l'ADN polymérase est inactivée, l'ADN bicaténaire néoformé progresse rapidement vers l'avant et la boucle reprend l'aspect qu'elle avait en A, permettant le dépôt d'une nouvelle amorce qui sera n + 2. Par la suite, les ARN amorces sont remplacés par les ADN polymérases I et les fragments d'Okazaki associés par une ligase (voir fig. IX-13).

les ARN polymérases, les hélicases se comportent en effet comme des protéines motrices capables de déplacer l'acide nucléique par rapport au réplisome immobile.

G. La duplication du nucléoïde bactérien

La duplication débute en un seul point, le point d'origine, souvent nommé *ori*. Il y a donc un seul œil de réplication encore appelé réplicon, les fourches progressant en sens opposé *(fig. IX-15)*.

La réplication du nucléoïde est extrêmement rapide ; elle se réalise en trente minutes en moyenne, dans des conditions favorables. L'ADN polymérase est donc capable d'enchaîner environ 500 nucléotides par seconde, avec une précision remarquable en ce qui concerne la complémentarité des bases.

La terminaison de la réplication ne s'effectue pas à un site particulier ; elle est interrompue lorsque les molécules dupliquées arrivent en contact. À ce moment les deux nucléoïdes circulaires sont entrelacés ; des topo-isomérases coupent alors les deux brins d'une double hélice puis les réassocient.

Les réplisomes des bactéries sont peu ou pas mobiles car certaines des protéines les constituant, indispensables à la réplication (comme par exemple le facteur DnaB), sont des protéines intégrées à la membrane plasmique ; la viscosité du cytoplasme interdit par ailleurs le déplacement d'aussi volumineux complexes macromoléculaires ; c'est donc bien l'ADN qui est mobile par rapport à eux.

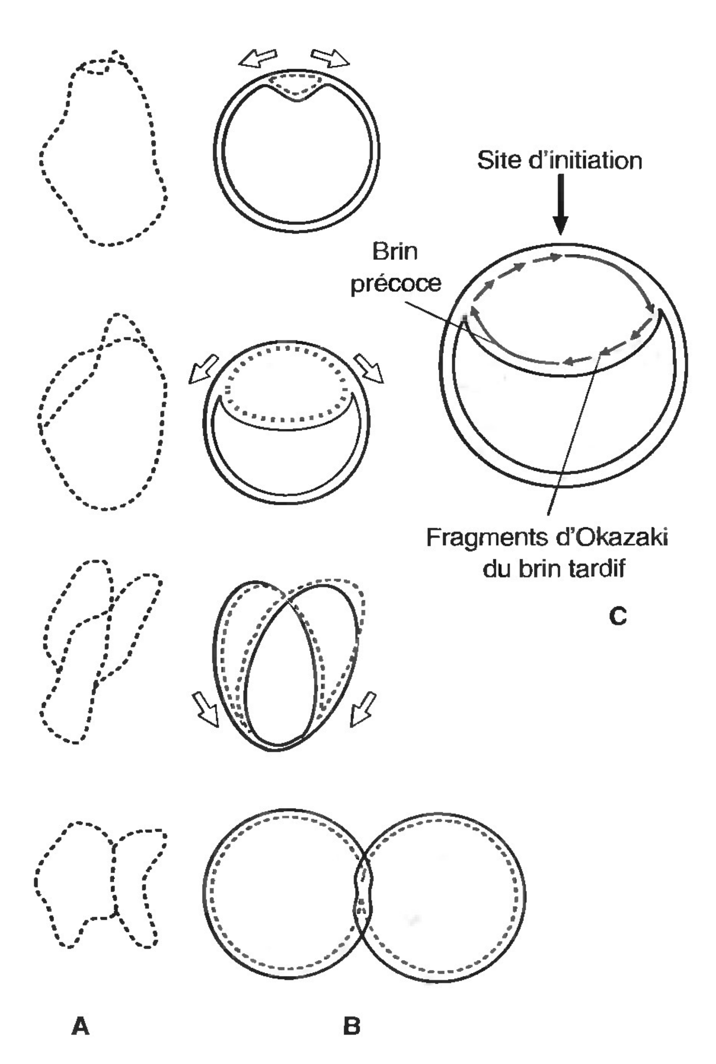


Fig. IX-15 : Réplication du nucléoïde bactérien.

A) Trace laissée sur l'émulsion photographique par des nucléoïdes radioactifs étalés.

B) Interprétation schématique des images obtenues (l'ADN néoformé est figuré en pointillés rouges).

C) Organisation de l'unique œil de réplication.

H. La duplication des chromosomes eucaryotes

Au niveau moléculaire, la réplication ne diffère pas fondamentalement chez les Eucaryotes et les Procaryotes ; les enzymes sont vraisemblablement très comparables et les différences que l'on peut noter sont minimes. Parmi elles, on peut citer la longueur des fragments d'OKAZAKI qui sont beaucoup plus courts puisqu'ils intéressent entre 100 et 200 nucléotides (1 000 à 2 000 chez les Procaryotes) et la liaison très probable des réplisomes, ces volumineux complexes enzymatiques, au nucléosquelette.

Les différences principales sont liées à la taille plus importante du génome eucaryote et à la plus grande complexité de son organisation.

Chaque chromosome eucaryote est en effet une molécule d'ADN linéaire, composée par l'association de plusieurs millions de nucléotides ; il y a donc 46 molécules d'ADN différentes dans le noyau cellulaire chez l'homme. Dans le noyau des cellules embryonnaires, les extrémités de chacun de ces chromosomes sont constituées par de courtes séquences, $^{5'}$TTAGGG$^{3'}$, répétées 2000 fois. Ce sont les

télomères. Chaque extrémité d'un chromosome se présente donc ainsi :

5'←——TTAGGGTTAGGG---TTAGGGTTAGGG3'
3'←——AATCCCAATCCC---AATCCCAATCCC5'

Ces structures jouent un rôle extrêmement important dans la cellule car, outre le fait qu'elles facilitent l'arrimage des chromosomes à la lamina (voir p. 188), elles évitent les liaisons entre molécules d ADN, donc entre chromosomes différents, recombinaisons qui sont en effet potentiellement létales ; interdisant la soudure des chromosomes, ils permettent le maintien d'une information génétique répartie sur plusieurs molécules d'ADN.

Les télomères, qui présentent une organisation tridimensionnelle en boucle ou en T, sont donc des structures essentielles ; leur disparition conduit à la mort de la cellule.

Une autre différence notable avec les cellules procaryotes concerne la vitesse de la réplication. Elle est beaucoup moins rapide ; la polymérase n'enchaîne en effet que 50 nucléotides par seconde environ, ce qui est vraisemblablement dû à l'organisation nucléosomique du génome. Par ailleurs, la longueur de l'ADN constituant un chromosome est bien supérieure à celle d'un nucléoïde. Un chromosome humain moyen contient environ 150 millions de paires de nucléotides. Avec un rythme de réplication de 50 nucléotides par seconde, il faudrait environ 800 heures pour que le chromosome soit dupliqué. Or toutes les observations indiquent que cette duplication est réalisée en huit heures environ. Il existe donc plusieurs sites d'initiation *(fig. IX-16)*, approximativement une centaine, répartis sur l'unique molécule d'ADN constituant le chromosome. On peut mettre en évidence ces multiples yeux de réplications (ou réplicons) en procédant comme cela a été fait pour la bactérie. Culture de cellules d'abord en présence de thymidine tritiée à faible activité, puis de thymidine tritiée à forte activité, étalement moléculaire et autoradiographie. La forte radioactivité permet de voir qu'il existe, là aussi, une progression bidirectionnelle de la duplication et de constater que de multiples yeux de réplication sont présents. Il y a donc nécessairement plusieurs sites d'origine de réplication dont l'activation n'est pas synchrone dans un noyau. Entre deux sites d'initiation, on a compté entre 45 000 et 300 000 paires de nucléotides ; les réplicons sont donc d'importance très inégale.

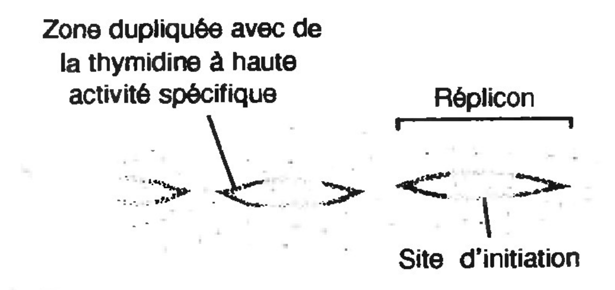


Fig. IX-16 : Mise en évidence de la progression bidirectionnelle des fourches de réplication chez les Eucaryotes.

Lorsque la fourche d'un œil de réplication rencontre la fourche d'un œil adjacent, les deux molécules d'ADN sont libérées ; la duplication est à cet endroit terminée. Toutefois, le chromosome n'étant pas circulaire, mais linéaire, le mode de terminaison est, aux extrémités de chaque molécule d'ADN, différent de celui observé dans le nucléoïde.

En effet, l'œil de réplication le plus proche de l'extrémité d'un chromosome a un mode de fonctionnement différent : au niveau du brin précoce, la lecture dans le sens 3' vers 5' permet la progression de l'ADN polymérase dans le sens normal d'enchaînement des nucléotides (5' vers 3') jusqu'à l'extrémité du brin ; par contre, au niveau du brin tardif, le positionnement de la dernière amorce ARN par la primase laisse toujours un certain nombre de désoxynucléotides qui ne seront pas pris en considération *(fig. IX-17)* ; la réplication ne pouvant avoir lieu, la molécule sera monobrin sur une longueur que l'on estime comprise entre 50 et 200 nucléotides.

Cette situation n'est pas stable ; la portion de molécule d'ADN se trouvant sous cette forme est sensible aux enzymes hydrolytiques, elle est détruite. En conséquence, à chaque cycle de réplication, le chromosome se raccourcit au niveau de ses télomères ce qui, compte tenu de ce qui a été dit précédemment, compromet grandement la durée de vie de la cellule.

Dans les cellules qui conservent un pouvoir de multiplication élevé, où donc sont réalisées

de multiples réplications, un processus particulier est mis en œuvre pour compenser cette érosion des télomères. C'est une enzyme particulière, ***la télomérase***, qui en ajoutant des séquences $^{5'}$TTAGGG$^{3'}$ va permettre la reconstitution des extrémités chromosomiques. La télomérase est une ribonucléoprotéine. La partie ARN de la molécule possède une séquence $^{3'}$CCCAATCCC$^{5'}$ qui est complémentaire des séquences télomériques ; la partie protéique contient la partie catalytique, c'est une enzyme de la famille des transcriptases inverses (voir encadré sur l'ADN complémentaire, page 220), qui permet donc la synthèse d'une molécule d'ADN à partir d'une matrice ARN. Le processus mis en œuvre est le suivant *(fig. IX-17)* : la télomérase se positionne au début du fragment monobrin du chromosome par appariement des trois cytosines de son ARN avec les trois guanines du fragment télomérique (3), ce qui laisse libre au niveau de son ARN la séquence $^{3'}$AATCCC$^{5'}$; celle-ci va servir de matrice et permettre à la transcriptase inverse de positionner et d'enchaîner les désoxynucléotides $^{5'}$TTAGGG$^{3'}$, ce qui correspond à une séquence télomérique (4) ; le télomère ayant ainsi été allongé, la télomérase glisse sur l'ADN monobrin et repositionne ses trois cytosines au niveau des guanines qu'elle vient de mettre en place (5), une nouvelle séquence télomérique peut alors être ajoutée (6). Le processus se répète jusqu'à l'extrémité du télomère (7 et 8) où la télomérase est libérée. Une primase positionne alors un ARN amorce qui va permettre la fixation d'une ADN polymérase qui enchaînera les désoxynucléotides dans le sens habituel de progression, de 3' vers 5' (9). Le télomère est alors reconstitué et un nouveau cycle de réplication peut être entamé. Comme chez les Procaryotes, ce sont des topoisomérases qui, en coupant et réassociant les brins d'ADN, réduisent les enchevêtrements produits entre les polynucléotides.

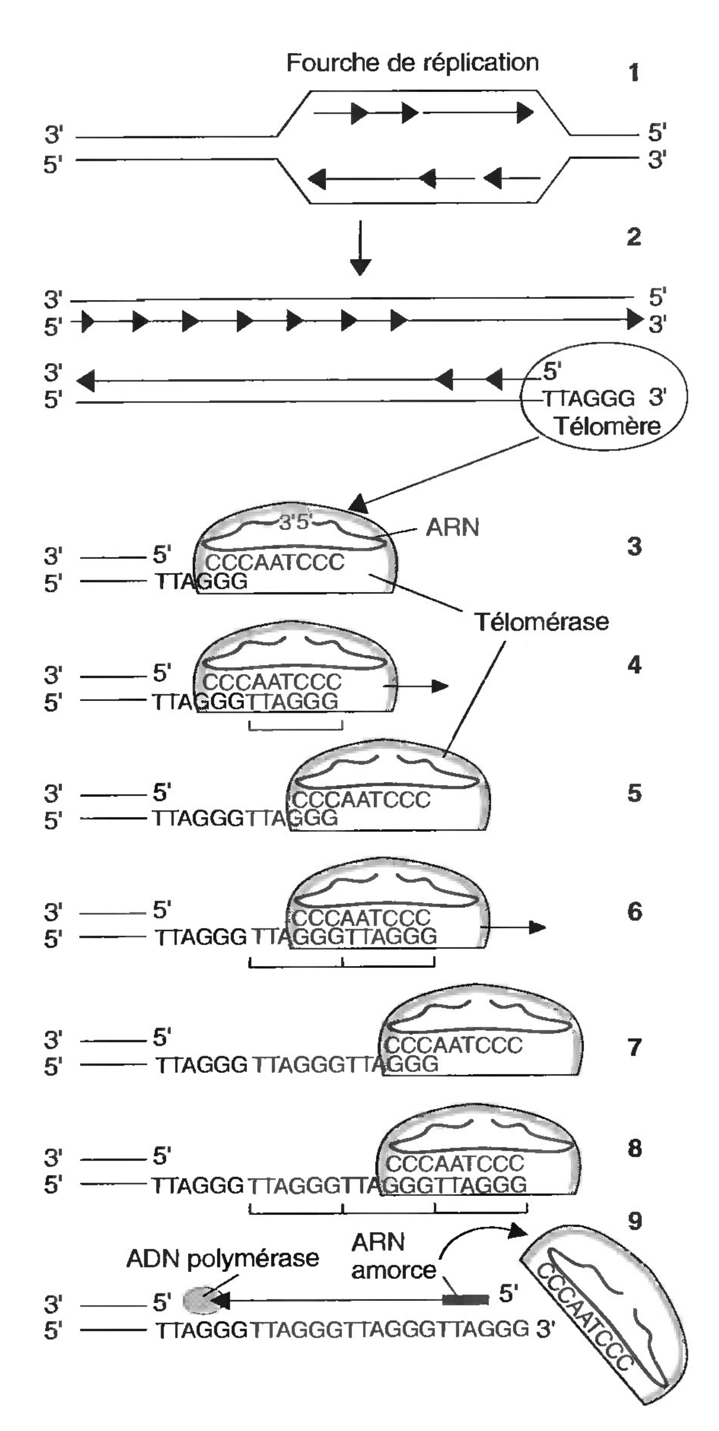


Fig. IX-17 : Télomérase et reconstitution des télomères.

La duplication de l'ADN de chaque chromosome s'accompagne de la mise en place de nouveaux nucléosomes. Le nombre de ceux-ci est doublé pendant la période de synthèse de l'acide nucléique. Les histones, protéines basiques constituant le cœur nucléosomique, sont synthétisées à partir d'un ARN messager dépourvu de queue poly (A), dont la durée de vie est, par conséquent, très brève. La synthèse des histones correspondant à une période très limitée de vie cellulaire, pratiquement à celle de la réplication de l'ADN, une grande quantité d'ARNm doit être libérée dans le cytosol au moment où s'amorce la duplica-

TÉLOMERES ET VIE CELLULAIRE

La plupart des cellules eucaryotes se divisent un nombre limité de fois, une centaine de divisions environ, souvent beaucoup moins. Seuls certains types cellulaires comme les protistes, les cellules germinales, les cellules souches, conservent leur pouvoir mitotique. Cette perte de l'aptitude à se diviser est sans rapport avec l'écoulement du temps; en effet, si on ralentit artificiellement les processus métaboliques, par le froid par exemple, on allonge la durée de vie mais pas le nombre de divisions; celui-ci reste constant, les mitoses sont simplement plus espacées.

Cette particularité est liée à la structure même des chromosomes eucaryotes. On a constaté en effet que ces derniers perdent à chaque division un nombre de paires de bases estimé entre 50 et 200, et ceci au niveau des télomères. Avec le raccourcissement de ces derniers, le rythme des divisions baisse et lorsqu'ils sont totalement érodés, elles cessent complètement, la cellule entre en sénescence.

Ce raccourcissement progressif est la conséquence d'une absence de l'enzyme assurant le rétablissement de la longueur correcte des extrémités chromosomiques, *la télomérase*. Cette enzyme est normalement transcrite dans les cellules embryonnaires, mais par la suite, le gène codant n'est plus exprimé. C'est plus précisément la sous-unité catalytique, celle ayant une activité transcriptase inverse qui est réprimée dans toutes les cellules, à l'exception des cellules souches de la peau, de celles du tissu hématopoïétique, de la lignée germinale...

Dans la plupart des cellules cancéreuses également (90 %), le niveau de télomérase demeure élevé. Cette réactivation de la synthèse de l'enzyme dans les tumeurs où les cellules se divisent de manière anarchique, démontre bien le rôle essentiel joué par l'enzyme dans la limitation de la durée de la vie cellulaire. Il établit également que l'inactivation de la synthèse de cette enzyme est un processus important assurant le contrôle du développement d'un organisme en limitant à certains tissus les capacités mitotiques, évitant ainsi une prolifération cellulaire excessive.

Cependant, la cancérisation n'est pas due au seul maintien, ou au rétablissement, de l'activité de la télomérase; dans des cellules où celle-ci a été artificiellement maintenue, la prolifération cesse malgré tout après une quantité plus ou moins importante de divisions; le nombre de celles-ci est donc également contrôlé par d'autres voies, comme celle de l'inhibition de contact, ou par l'apport de facteurs de croissance...

Peut-on espérer limiter le développement des cellules cancéreuses en inhibant seulement la télomérase? Cette inhibition, certes possible, entraînerait toutefois de tels effets secondaires sur le renouvellement des cellules sanguines, l'inactivation de la lignée germinale, le remplacement des cellules de la peau, qu'il est difficile de l'envisager.

tion. Cette hyperproduction d'un type d'ARNm aussi spécifique est possible parce qu'il existe une grande quantité de gènes codant ces protéines; *les gènes d'histones sont des gènes répétés.*

Le comportement des nucléosomes au moment de la duplication de l'ADN est actuellement l'objet de recherches nombreuses; on ignore en effet comment les ADN polymérases arrivent à dupliquer la molécule enroulée autour du cœur protéique; le nucléosome s'ouvre-t-il en deux demi-nucléosomes qui se réassocient ensuite? La question est encore un sujet de controverse.

Une fois synthétisées, les histones sont des molécules très stables et il semble établi qu'elles ont une durée de vie comparable à celle des polynucléotides de l'ADN. Dans ces conditions, on peut s'interroger sur le comportement des histones néoformées. Où vont-elles se positionner? S'associent-elles au brin tardif, les anciennes protéines accompagnant le brin précoce, comme on l'a longtemps supposé? Se répartissent-elles au hasard comme certains auteurs le prétendent actuellement, ce qui créé des octamères où anciennes et nouvelles histones sont mélangées? Là encore, il s'agit d'une question en suspens.

I. Conclusion : organisation de la chromatine dans le noyau interphasique

L'organisation du nucléofilament dans le noyau interphasique est un sujet qui a déjà été

abordé lorsque nous avons envisagé l'étude de la matrice nucléaire. Les données fournies par l'étude de la transcription puis de la duplication, permettent de le compléter.

Le chromosome fixé à la lamina par les télomères, les centromères et peut-être d'autres zones spécifiques, décrit dans le nucléoplasme *de vastes boucles*, ou *domaines*, très condensées en certains points, très déroulées en d'autres *(fig. IX-18)*. Le nucléofilament est lié aux fibres du nucléosquelette par des protéines de fixation ou de liaison (qui délimitent des zones fonctionnelles ou domaines fonctionnels), et des volumineux complexes enzymatiques de transcription ou de réplication ; ceux-ci étant plus ou moins liés à la matrice, c'est l'ADN qui se déplace vers eux.

Cette schématisation est encore très hypothétique et de nombreux points restent à préciser, mais elle permet de comprendre comment la cellule peut contrôler la mise à disposition d'une information particulièrement abondante ; située dans un compartiment de volume réduit, le noyau, et devant être utilisée à des moments bien déterminés, elle ne peut pas être disposée au hasard ; ce schéma permet de concevoir un mode fonctionnel de stockage d'une information biologique.

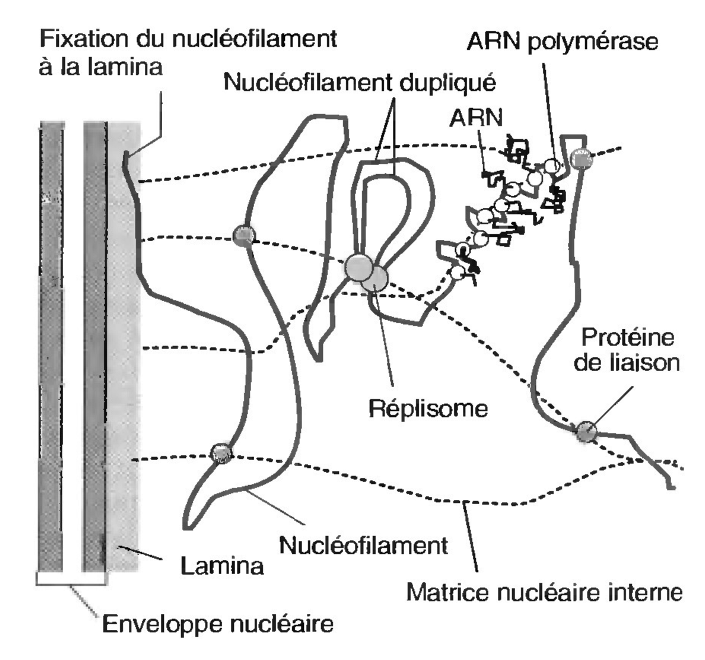


Fig. IX-18 : Organisation schématique du noyau interphasique.

3. LE PARTAGE ÉGAL DES GÉNOMES FILS

La croissance permet à la cellule d'atteindre une taille limite au-delà de laquelle la surface, qui croît comme le carré du rayon (si l'on suppose la cellule sphérique), devient insuffisante pour assurer les échanges avec le milieu extérieur, le volume du protoplasme ayant crû, lui, comme le cube du rayon. Une division devient indispensable.

Cette division suppose que l'information ait été préalablement doublée, c'est-à-dire que les chromosomes se soient dupliqués, mais cette réplication n'est pas en elle-même le facteur déclenchant la bipartition. De nombreuses cellules subissent en effet plusieurs cycles de réplication sans se diviser ; les cellules sont alors *polyploïdes*, il existe dans un seul noyau plusieurs exemplaires du même chromosome. En règle générale cependant, la bipartition cellulaire suit la réplication ; il s'établit ***un cycle cellulaire***. Les mécanismes de cette bipartition sont complexes et très différents selon que l'on considère une cellule procaryote ou une cellule eucaryote.

3.1. DIVISION ET CYCLE CELLULAIRES CHEZ LES PROCARYOTES

Une cellule bactérienne placée à 37 °C dans un milieu nutritif contenant les acides aminés, les nucléotides et les différentes molécules organiques nécessaires à son développement peut se diviser toutes les vingt à trente minutes.

Après que les topo-isomérases ont démêlé les nucléoïdes, enchevêtrés après la duplication, ces derniers sont progressivement séparés *(fig. IX-19, A)*. Ils sont alors liés à des complexes macromoléculaires associés ou situés près du plasmalemme. Ces complexes sont susceptibles de se déplacer latéralement mais on ignore la nature du mécanisme moteur et sa localisation. Lorsqu'ils sont suffisamment éloignés, ils s'immobilisent en des points situés *très précisément* au 1/4 et au 3/4 de la longueur de la cellule mère *(fig. IX-19, B)*; le plasmalemme s'invagine alors dans la région médiane, constituant une dépression annulaire qui progresse de manière centripète *(fig. IX-19, C)*; dans cette dépression est élaborée une nouvelle paroi. On ne connaît pas le mécanisme exact permettant l'invagination du plasmalemme. Chez les Procaryotes, il n'y a pas de cytosquelette du type de celui rencontré chez les Eucaryotes; toutefois, on a isolé récemment chez les bactéries des protéines, appelées FtsZ, qui seraient les homologues des tubulines; elles auraient un rôle cytosquelettique et interviendraient dans la formation de la constriction annulaire conduisant à la bipartition cellulaire. On a également mis en évidence ces protéines dans les chloroplastes.

Ces FtsZ sont des protéines globulaires qui possèdent un site de liaison au GTP; associées à ce dernier elles s'assemblent en protofilaments rectilignes *(fig. IX-19, D)*. Lorsque le GTP est hydrolysé, la conformation moléculaire change et les protofilaments se recourbent. Ce serait l'augmentation de cette courbure, et son extension progressive à tous les protofilaments associés au plasmalemme dans la région équatoriale de la cellule, qui entraînerait la formation de l'invagination annulaire aboutissant à la bipartition de la cellule.

Les nucléoïdes sont alors très précisément situés au centre des cellules filles.

Dans les conditions favorables, la croissance de la cellule se poursuit sans interruption; il y a formation de ribosomes, synthèse de protéines même pendant la bipartition et la phase de réplication de l'ADN. Cette dernière ne débute toutefois jamais avant que la cellule ait atteint une dimension déterminée, appelée *taille critique*, mais on ignore ce qui la détermine; on commence seulement à analyser les *mécanismes qui permettent d'éviter une duplication* précoce et la membrane plasmique semble jouer dans ce domaine un rôle déterminant.

La réplication est contrôlée par les protéines initiatrices qui reconnaissent des séquences de bases situées au point où doit débuter la synthèse (point *ori*) lorsqu'elles sont à l'état monomérique; elles se fixent à l'ADN, autorisant l'ouverture de la molécule permettant l'accès des complexes de réplication. Ces protéines deviennent inactives lorsqu'elles ne sont plus à l'état monomérique, or les phospholipides du plasmalemme sont des agents favorisant l'agrégation des monomères, ce qui peut être considéré comme un premier méca-

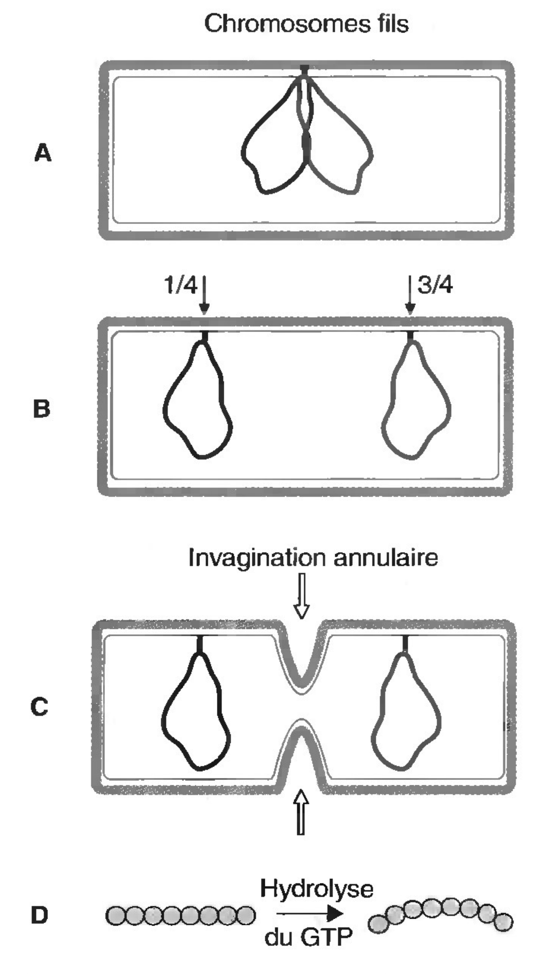


Fig. IX-19: Bipartition cellulaire chez une bactérie.
A et B) Séparation des nucléoïdes.
C) Formation de la paroi par invagination annulaire.
D) Protofilaments de FtsZ et leur courbure après hydrolyse du GTP.

nisme régulateur, limitant les possibilités de duplication précoce.

Une seconde possibilité d'intervention du plasmalemme se situe au niveau de séquences $^{5'}GATC^{3'}$ répétées, localisées au point d'initiation. Juste avant la duplication, ces séquences sont méthylées (liées à des groupements CH_3) sur les deux brins. Après la duplication, chaque molécule-fille ne possède plus qu'un seul brin méthylé; or, il existe *dans la membrane plasmique* procaryote une protéine qui présente une forte affinité pour ces séquences lorsqu'elles ne sont pas méthylées; on suppose donc que celles-ci se lient à cette protéine *immédiatement après la réplication*; profondément insérées dans la membrane, elles deviennent alors inaccessibles aux protéines d'initiation.

Ces mécanismes tentent d'expliquer pourquoi les réplications ne se suivent pas sans interruption mais on ignore quels sont les mécanismes qui permettent l'extraction du site d'initiation, comment est réalisée la méthylation du second brin et donc comment un nouveau cycle est amorcé.

3.2. LA BIPARTITION CHEZ LES EUCARYOTES : MITOSE ET CYCLE CELLULAIRE

Chez les Eucaryotes, nous l'avons vu, la réplication de l'ADN peut se réaliser sans qu'il y ait de bipartition cellulaire. Ces cas demeurent toutefois exceptionnels et en règle générale il existe un *cycle cellulaire (fig. IX-20)* résultant de l'interaction de deux cycles : un cycle de réplication de l'ADN et un cycle cytoplasmique, maintenus en phase par des processus de régulation complexes, encore incomplètement compris, mais qui font actuellement l'objet de nombreux travaux.

A. *Le cycle cellulaire*

a. *Mise en évidence*

Lorsqu'on donne pendant un laps de temps très bref de la ^3H thymidine à haute activité spécifique à des cellules en culture ou à des organes animaux ou végétaux (racine par exemple), on constate, après fixation et autoradiographie, qu'un faible pourcentage seulement des cellules a utilisé le précurseur radioactif. Une conclusion s'impose : seules quelques cellules étaient en période de réplication de l'ADN pendant le pulse.

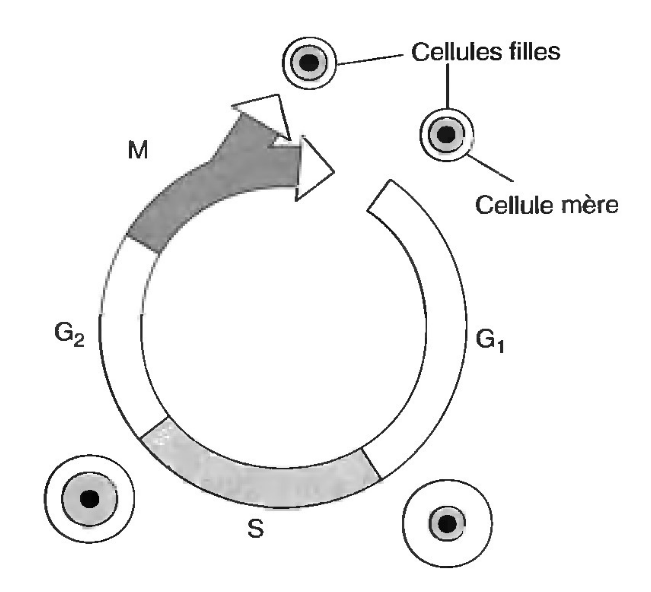


Fig. IX-20 : Cycle cellulaire.

Parmi celles qui ne sont pas radioactives, on note des cellules en cours de mitose et d'autres apparemment peu différentes, en ce qui concerne leur organisation morphologique, de celles ayant incorporé le précurseur. La coexistence, dans un même tissu, de cellules en cours de division et de cellules en période de réplication de l'ADN – et, dans un syncitium, de noyaux en cours de mitose et d'autres en cours de synthèse *(fig. IX-21)* – démontre l'indépendance des deux phénomènes. Le faible pourcentage de cellules en cours de réplication indique en outre que la duplication des chromosomes n'intéresse qu'une partie de la durée de la vie cellulaire.

Par cette même méthode, on peut également déterminer de manière approximative le temps qui sépare, dans le cycle cellulaire, la synthèse de l'ADN et la division cellulaire (la mitose). Il suffit de donner *pendant quelques minutes* de la ^3H thymidine haute activité à des cellules en culture, puis de les transférer dans un milieu froid (t_0). Toutes les cellules en cours de synthèse pendant le pulse seront radioactives ; on repère, parmi celles-ci, *celles qui*

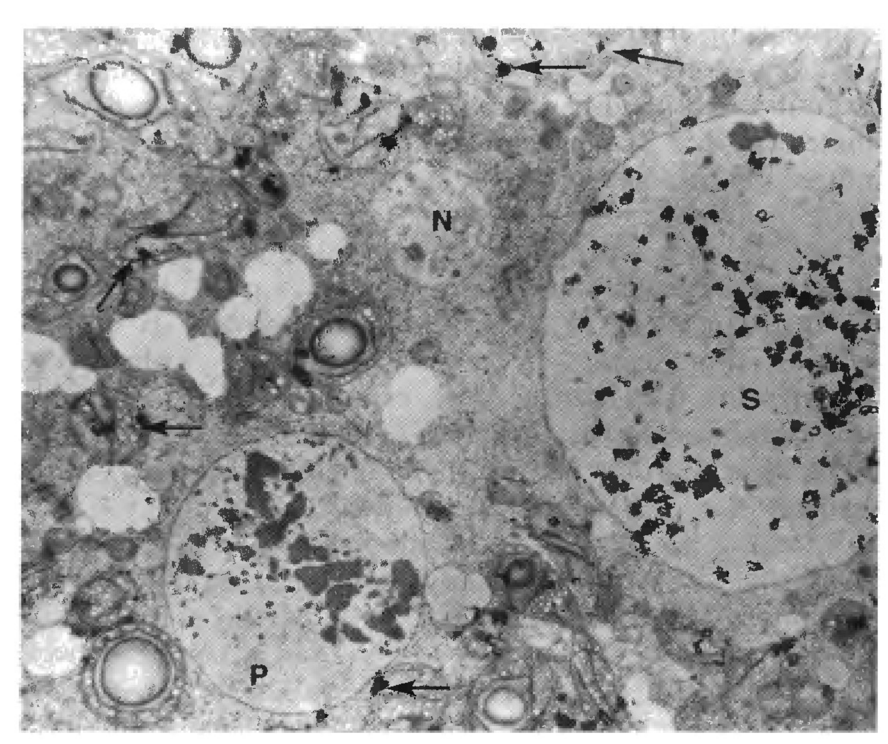


Fig. IX-21 : Noyaux et synthèse d'ADN.
Le très jeune embryon d'une fougère aquatique, *Marsilea*, a été cultivé en présence de ^{3}H thymidine et traité par la colchicine pour que les cellules formées ne se séparent plus en télophase. Après fixation et autoradiographie, l'observation des sections ultrafines en microscopie électronique montre, dans le syncitium ainsi formé, des noyaux en fin de prophase de mitose (P), des noyaux qui ne sont pas en cours de division (S et N). Le pulse ayant été bref, seuls les noyaux qui étaient en cours de synthèse au moment de la fixation sont radioactifs (S), ceux qui étaient en cours de mitose (P) et ceux en phase G_1 ou G_2 (N) ne le sont pas, ce qui montre la relative indépendance des différents organites (et des cellules lorsque l'expérience est effectuée avec un tissu) en ce qui concerne le déroulement du cycle.
Notez également la présence de grains d'argent au-dessus de plastes et de mitochondrie (flèches) ; l'ADN de ces organites se réplique indépendamment de celui du noyau. G. x 4 000.
(Cliché M. FERRAND, E. CHENOU et J. KULIGOWSKI.)

sont en cours de mitose dans les heures qui suivent (fig. IX-22).

Les premières cellules radioactives en début de division apparaissent environ trois heures après la mise en contact avec le précurseur ; on peut en déduire qu'il existe une période relativement longue (3 h) entre la fin de la phase de synthèse (où les cellules sont encore capables d'incorporer le précurseur) et le début de la mitose.

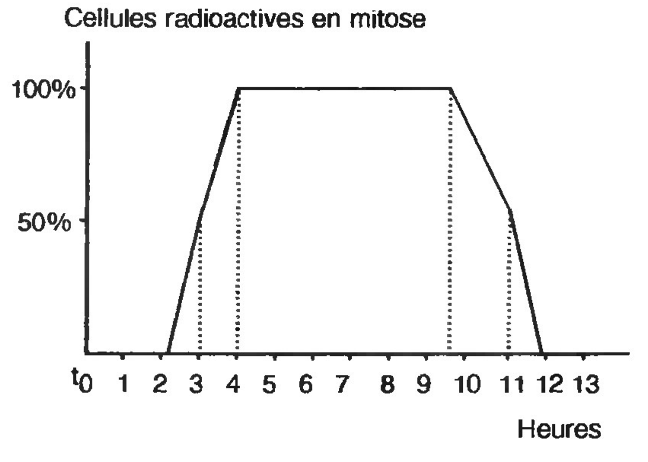


Fig. IX-22 : Dénombrement des cellules en début de mitose qui sont radioactives dans les heures qui suivent un pulse très court (incorporation de ^{3}H thymidine).

Comme on trouve des cellules en début de mitose pendant 8 heures (entre 3 et 11 heures après le pulse) on peut conclure de cette expérience que la phase de synthèse d'ADN, ou *phase S*, dure 8 heures. En effet, les cellules radioactives en début de division trois heures après le pulse sont des cellules qui terminaient la duplication de leur ADN ; par contre celles qui sont au commencement de la mitose à t_0 + 11 heures ne peuvent être que celles qui commençaient leur synthèse. Si on déduit de ces onze heures les trois heures du temps de latence, on peut estimer à 8 heures la durée de la phase S.

Ces méthodes ne permettent pas toutefois d'appréhender de manière simple la succession des phases du cycle cellulaire, ni d'apprécier leur importance relative.

b. La durée du cycle cellulaire

La période qui sépare deux divisions varie de manière importante selon les organismes, la nature des tissus, l'âge des cellules. Les obser-

vations faites sur des *cellules vivantes* montrent que, dans les cas les plus favorables, ces divisions se produisent au rythme de une toutes les 16 à 24 heures et que la durée de la mitose proprement dite se situe entre une et deux heures.

Les caractères biochimiques et la durée des différentes phases peuvent être identifiés par plusieurs méthodes. La *microcytophotométrie* est l'une d'entre elles.

La réaction de Feulgen est, rappelons-le, une réaction colorée mettant en évidence, par la fuchsine, les fonctions aldéhyde libérées par hydrolyse acide des liaisons entre le désoxyribose et les bases puriques. *L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre des fonctions aldéhyde libérées, par conséquent à la quantité d'ADN présent.*

Le principe de la méthode consiste à confectionner, dans un tissu où les cellules se multiplient activement, des coupes fines d'épaisseur rigoureusement constante, légèrement supérieure au diamètre d'un noyau. Les coupes sont observées en microscopie photonique, les noyaux entiers et les figures de division sont repérés; on les fait alors traverser par un faisceau lumineux extrêmement fin et l'on mesure la quantité de lumière transmise. Bien entendu, celle-ci varie avec l'intensité de la coloration, *c'est-à-dire avec la quantité d'ADN présent.* Plus celui-ci est abondant, plus la fuchsine a été fixée et plus les photons sont retenus. C'est donc une *méthode d'estimation quantitative par comparaison*; elle ne donne pas une valeur absolue de la quantité d'ADN contenue dans un noyau.

On peut relier ces résultats quantitatifs à la durée du cycle par deux méthodes distinctes.

• En opérant sur un grand nombre d'échantillons, on peut déterminer le pourcentage de cellules contenant la même quantité d'ADN. Si on utilise comme matériel biologique un tissu d'Eucaryote supérieur (animal ou végétal), on trouve, parmi les noyaux qui ne sont pas en cours de mitose, 40 % qui contiennent une quantité simple d'ADN, *deux compléments (2C) d'ADN*, 20 % qui en possèdent une quantité double, *quatre compléments (4C)*, et 40 % pour lesquels la valeur déterminée se situe entre 2C et 4C *(fig. IX-23)*. Si le cycle cellulaire est de vingt heures, avec une phase de division qui dure une heure, il est possible de distinguer: une **phase G_1** (G pour *gap*, intervalle en anglais) de huit heures où chaque noyau possède 2C d'ADN, une **phase S** (S pour synthèse d'ADN) de huit heures pendant laquelle la quantité d'ADN augmente progressivement, une **phase G_2** de trois heures où 4C d'ADN sont présents par noyau et une **phase M** (M pour mitose) de une heure qui se caractérise par une division brutale de la quantité d'ADN, celui-ci étant partagé entre les deux noyaux fils*.

• Certaines cellules se divisent naturellement de manière synchrone (premières divisions de segmentation d'un œuf par exemple), mais il s'agit de cas exceptionnels. On sait également *synchroniser des cycles cellulaires.* Le principe est simple. Des cellules en culture sont bloquées à une période déterminée de leur cycle (entrée en mitose, phase de synthèse) par un agent chimique. Toutes les cellules d'un même tissu vont progressivement se trouver arrêtées au même stade; lorsque l'agent chimique est éliminé, le cycle reprend dans toutes les cellules de manière synchrone. Ce synchronisme ne dure pas; au bout de quelques cycles

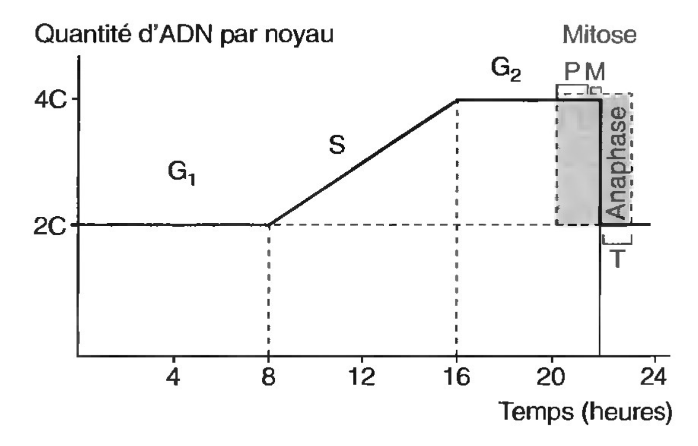


Fig. IX-23: Évolution de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire.
P, prophase; M, métaphase; T, télophase; l'anaphase, très brève, correspond au trait vertical.

* Ces cellules somatiques diploïdes contiennent un double jeu, 2n, de chromosomes (voir p. 171); en conséquence, on trouve 2C d'ADN en G_1 et 4C en G_2, la valeur C correspondant à la valeur mesurée sur les cellules haploïdes (gamètes). Une cellule en G_2 contient donc 4 jeux de chromosomes (4n), elle est en fait tétraploïde.

les différences entre les cellules se manifestent de nouveau et, s'additionnant, aboutissent à une désynchronisation complète.

À partir de ces cellules à cycles synchronisés, on peut déterminer avec précision l'ordre des différentes phases, leurs caractéristiques et leur durée en effectuant des prélèvements et des mesures à intervalles réguliers.

c. Le déroulement du cycle cellulaire

Les différentes phases du cycle n'ont bien entendu pas la même signification sur le plan biologique.

La phase G_1, souvent qualifiée de présynthèse en raison de la position qu'elle occupe par rapport à la synthèse de l'ADN, est une période de croissance active. Elle commence à la fin de la mitose et s'achève lorsque débute la réplication. Pendant cette période, des ribosomes, les précurseurs de l'ADN, de nombreuses protéines sont élaborés et la taille de la cellule s'accroît jusqu'à atteindre la *taille critique* à partir de laquelle l'entrée en phase S devient possible.

La phase S correspond à la réplication de l'ADN ; elle ne se déclenche que lorsque la cellule a atteint la taille critique et débute dès la mise en activité des premières unités de réplication. Elle se manifeste d'abord par la synthèse des enzymes et des précurseurs impliqués dans la duplication. Elle progresse par mise en activité successive de nouvelles unités de réplication. C'est également la période pendant laquelle les gènes histones sont transcrits et ces protéines élaborées en grandes quantités dans le cytoplasme. Au début de la phase S le chromosome est constitué par un seul nucléofilament, **une chromatide** ; lorsqu'elle se termine le chromosome est constitué par deux nucléofilaments, **deux chromatides** réunies au niveau d'une région particulière, le **centromère** *(fig. IX-24)*.

La phase G_2 est une phase de préparation à la mitose, période pendant laquelle sont produits les enzymes et les facteurs de régulation indispensables au déroulement de la division. Sa durée est généralement constante.

La phase M est la période de division proprement dite, celle où les chromosomes se condensent puis se répartissent entre les cellules filles. Elle se termine par la bipartition cellulaire.

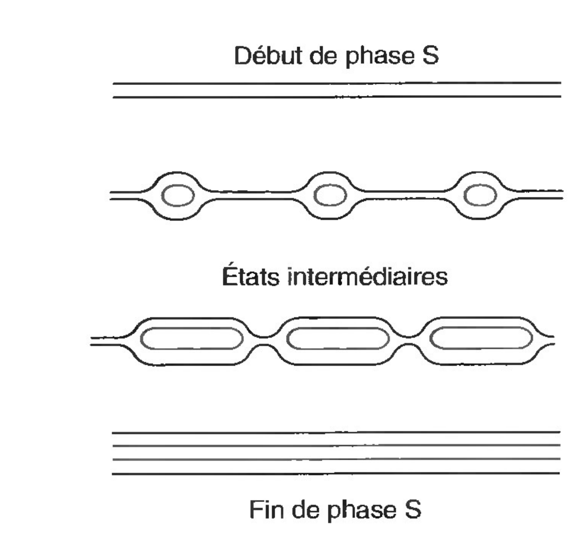


Fig. IX-24 : Évolution du nucléofilament au cours de la phase S.

B. Le déroulement de la mitose

La mitose est un phénomène extrêmement spectaculaire lorsqu'il est observé *in vivo* ; elle se caractérise par la condensation des chromosomes, chacun constitué par les deux chromatides issues de la réplication ; celles-ci se séparent ensuite et se répartissent équitablement en deux lots identiques.

La mitose est un phénomène continu qui, par commodité, a été divisé en plusieurs phases, chacune caractérisée par l'état des chromosomes et leur localisation dans la cellule.

a. La duplication du centrosome et la formation de l'aster

Dans les cellules animales, le centrosome est constitué par deux centrioles disposés orthogonalement, c'est ***le diplosome***, entouré d'un matériel dense *(fig. IX-25)*.

Chaque centriole est un cylindre de 0,25 µm de diamètre mais dont la longueur varie selon les organismes, non limité par une membrane ; il est formé par l'association de neuf triplets de microtubules *(fig. IX-26)* ; observé en coupe, il révèle une symétrie axiale. Sa struc-

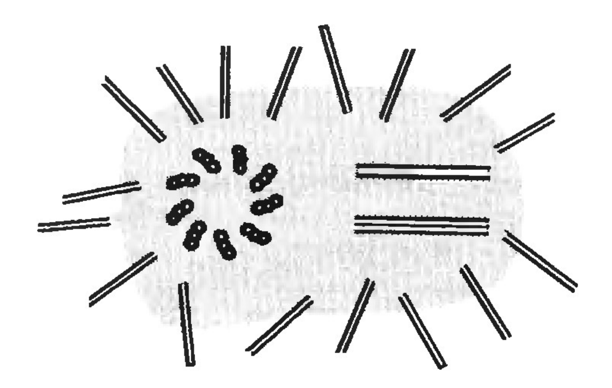


Fig. IX-25 : Centrosome.
Les deux centrioles, disposés orthogonalement, sont situés au centre d'un matériel dense qui est un centre organisateur de microtubules.

ture est très constante chez les Eucaryotes animaux ; ses dimensions également. Des expériences de transplantation ont montré qu'il ne semblait pas y avoir de barrière spécifique pour cet organite. Son extraction par micromanipulation empêche la division des cellules.

La présence de cet organite n'est pas constante. Les végétaux supérieurs en sont dépourvus et de nombreux champignons et algues ont des « *structures centrosomales* » organisées différemment, comme le sont par exemple les plaques denses associées à l'enveloppe nucléaire chez la levure.

Dans une cellule animale, les deux centrioles d'un diplosome sont entourés par un nuage de matériel amorphe. Ce matériel est *un centre organisateur de microtubules**, car il est capable de catalyser l'assemblage de ces éléments cytosquelettiques. Dans la zone péricentriolaire, se trouve en effet un constituant essentiel, la tubuline γ, différent des formes α et β, qui servirait de germe pour la polymérisation des tubulines. Les tubulines γ et les protéines qui leur sont associées, des MAPs (pour Microtubules Associated Proteins) constituent un support hélicoïdal à partir duquel les microtubules s'organisent et s'accroissent par addition de sous-unités α et β à leur extrémité + *(fig. IX-27). C'est donc ce matériel péricentriolaire qui est le centre de nucléation.* Il s'ensuit que le centrosome est entouré par des microtubules rayonnants, relativement longs, peu nombreux et très instables car ils sont en perpétuel remaniement. On a également démontré que, dans le centrosome, certaines protéines n'apparaissent qu'au moment de la mitose ; elles sont impliquées

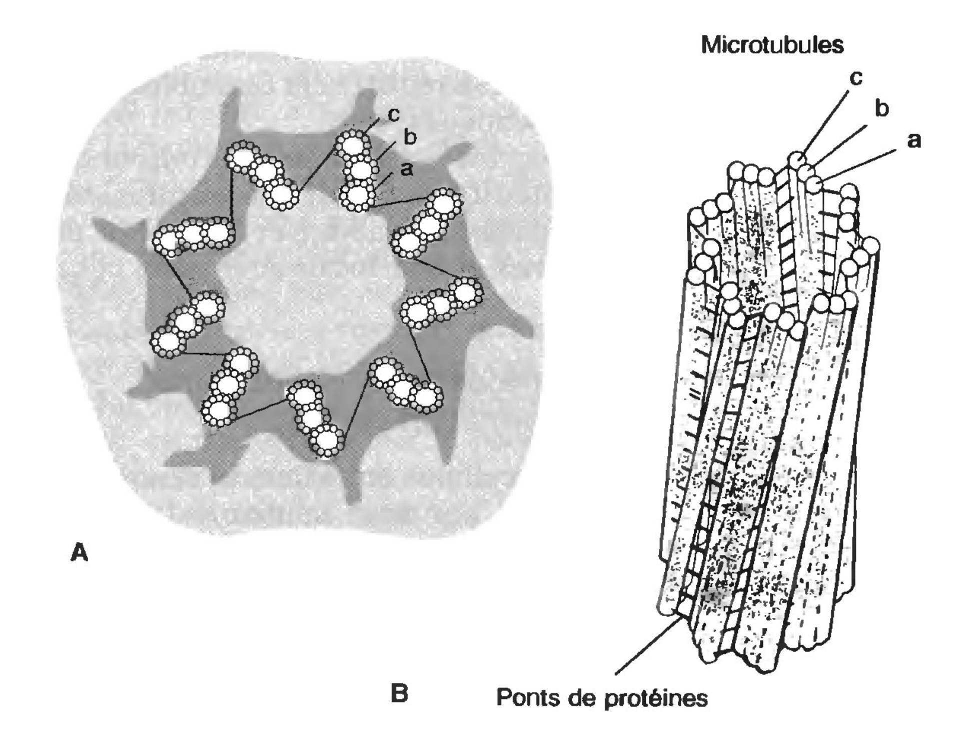


Fig. IX-26 : Centriole, coupe transversale (A) et reconstitution schématique (B).
C'est un organite cylindrique de 0,4 µm de long sur 0,2 µm de diamètre. Il est constitué par neuf triplets de microtubules dont la disposition est classiquement comparée à celle des aubes d'une turbine. Seul le tubule a, le plus proche de l'axe est complet et formé par 13 protofilaments, les tubules b et c n'en comportent que 10 car ils partagent les 3 autres avec le microtubule adjacent. La cohésion de l'ensemble est assurée par des protéines, notamment celles qui relient les tubules a d'un triplet au tubule c du triplet voisin.

* Un matériel de même nature entoure les structures centrosomales rencontrées chez les algues et les champignons.

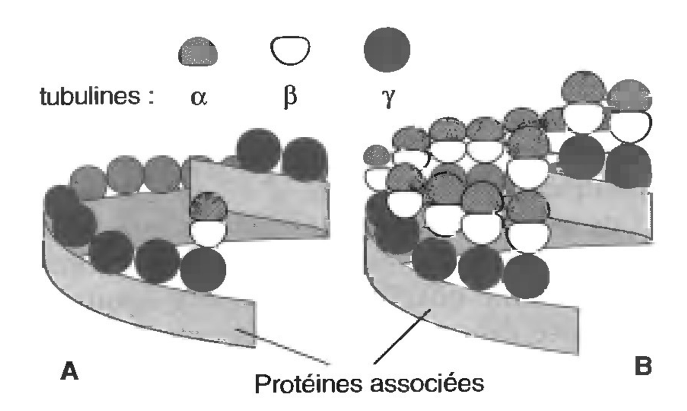


Fig. IX-27 : Tubulines γ et organisation des microtubules.

Treize molécules de tubulines γ associées de manière plus ou moins hélicoïdale à un ensemble complexe de protéines dirigent l'assemblage des hétérodimères conduisant à la formation des 13 protofilaments constituant l'ébauche d'un microtubule.
(D'après J. MARC.)

dans la nucléation des microtubules et la formation du fuseau. Certaines de ces molécules sont normalement localisées dans le noyau ; elles s'associent au centrosome dès que l'enveloppe nucléaire est rompue ; leur rôle est encore mal compris.

La réplication des centrosomes se produit en phase S. Les deux centrioles d'un diplosome se séparent légèrement et chacun engendre, à son contact, un très court procentriole ; le mécanisme moléculaire intervenant au cours de cette réplication n'est pas connu. L'élongation de ces procentrioles se poursuit durant les phases S et G_2.

Lorsque la cellule entre en mitose, les microtubules cytoplasmiques sont progressivement résorbés, la cellule perd la forme qui la caractérisait et s'arrondit.

Simultanément, les centrosomes changent d'aspect. Le matériel péricentriolaire devient plus important et des microtubules plus courts, plus nombreux, plus stables, rayonnent autour des diplosomes. L'extrémité + étant située à l'extrémité distale, les microtubules s'allongent progressivement par addition de sous-unités αβ. Ils se regroupent alors en faisceaux, probablement grâce à l'intervention de protéines motrices, faisceaux qui deviennent alors identifiables en microscopie photonique ; le diplosome entouré des microtubules forme alors ***l'aster***.

Lorsque la condensation des chromosomes s'amorce, les deux asters se séparent *(fig. IX-28)*, contournent le noyau dont l'enveloppe nucléaire commence à se désorganiser, et gagnent des territoires cellulaires diamétralement opposés. Durant cette migration, la plupart des microtubules astériens se concentre et s'accumule en faisceaux qui contournent plus ou moins le noyau : c'est *le fuseau mitotique*, souvent encore appelé fuseau achromatique, car en microscopie photonique, les tubulines qui le constituent ne fixent pas les colorants usuels.

Le déplacement des centrioles semble régi par des interactions entre les microtubules qui les unissent et qui sont en cours d'élongation ; les drogues inhibant la polymérisation des microtubules arrêtent en effet le déplacement des centrioles ; des protéines motrices interviennent également *(fig. IX-28, D)* ; elles permettent le glissement d'un microtubule issu d'un des asters par rapport à un autre microtubule organisé à partir de l'autre aster ; il est également probable que ces moteurs moléculaires autorisent l'association dynamique de

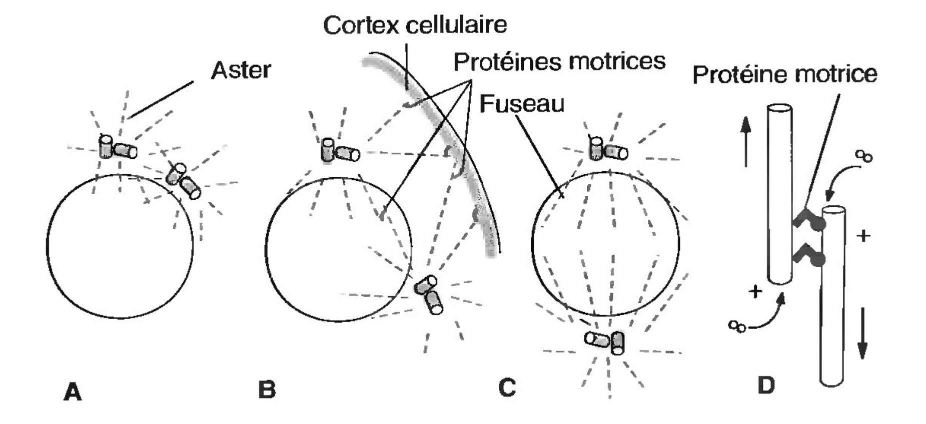


Fig. IX-28 : Migration des asters et formation du fuseau mitotique.

A à C) Déplacement des diplosomes.
D) Ce déplacement est le résultat de l'intervention de protéines motrices, dont la dynéine et de la polymérisation des microtubules. Les flèches indiquent le sens de déplacement des microtubules.

microtubules astériens et d'éléments cytosquelettiques qui, sous le plasmalemme, constituent le cortex cellulaire ; ceci permettrait le contournement du noyau.

b. Les phases de l'évolution nucléaire (*fig. IX-29*)

La mitose commence par une condensation progressive des chromosomes ; lorsque celle-ci est achevée, la lamina se désagrège et l'enveloppe nucléaire se désorganise ; cette première période, la plus longue de la mitose, constitue ***la prophase***. À la fin de celle-ci, les chromosomes sont très condensés ; on reconnaît leur forme caractéristique et les deux chromatides qui constituent chaque chromosome sont alors visibles bien qu'elles restent étroitement associées.

Durant la prophase, les transcriptions d'ARN se réduisent progressivement, conséquence d'une condensation chromatinienne de plus en plus intense ; les ARN ribosomaux cessent d'être produits, ce qui entraîne d'abord la réduction, puis la disparition du nucléole.

La rupture de l'enveloppe nucléaire permet alors aux microtubules fusoriaux de gagner le territoire qui, auparavant, constituait le nucléoplasme. Une nouvelle phase est ainsi induite, c'est ***la prométaphase***. C'est une période transitoire caractérisée par un déplacement, d'abord oscillant puis de plus en plus orienté, des chromosomes qui les conduit progressivement à s'aligner dans le plan médian de la cellule.

Cette disposition, qualifiée de plaque équatoriale, est caractéristique de la phase suivante, ***la métaphase***. Les chromosomes sont alors disposés en un anneau plus ou moins régulier localisé à égale distance des pôles du fuseau. La position des deux chromatides constituant chaque chromosome est particulière à ce stade ; elles sont partiellement séparées l'une de l'autre, leurs extrémités distales étant plus ou moins orientées vers les pôles du fuseau tandis que la zone au niveau de laquelle elles restent associées, ***le centromère***, demeure située dans le plan équatorial.

Les deux chromatides de chaque chromosome se séparent brusquement puis chacune se déplace vers l'un des pôles de la cellule, centromère en avant : c'est ***l'anaphase***. Au terme de cette période très brève, à chaque pôle du fuseau se trouve regroupé un lot de chromosomes fils ; les deux lots sont rigoureusement identiques.

Les chromosomes rassemblés aux pôles commencent à se décondenser progressivement et l'ensemble enveloppe nucléaire-lamina se réorganise autour : les noyaux se reconstituent, c'est ***la télophase***. Le retour des nucléofilaments à l'état interphasique autorise la reprise des transcriptions ; autour de chacun des organisateurs nucléolaires, dont on se souvient qu'ils sont répartis sur plusieurs chromosomes, un petit nucléole se reconstitue ; le plus souvent ces petits nucléoles fusionnent pour n'en former qu'un nombre plus réduit, voire un seul.

Cette évolution complexe, qui aboutit à la division du noyau de la cellule mère en deux noyaux fils, constitue ce que l'on appelle ***la caryocinèse***. Elle est suivie par la division de la cellule. Celle-ci, ***la cytodiérèse***, débute vers la fin de l'anaphase par le creusement d'une dépression annulaire, perpendiculaire à l'axe du fuseau, située à mi-distance des chromosomes regroupés, c'est-à-dire au niveau de l'ancienne plaque équatoriale. Cette dépression progresse de manière centripète jusqu'à ce que les deux cellules soient séparées. Au cours de cette période, le fuseau se désorganise progressivement et, à partir du stock des tubulines ainsi libérées, le cytosquelette se reconstitue ; les cellules filles perdent leur forme sphérique et reprennent l'aspect propre aux cellules du tissu auquel elles appartiennent.

La division cellulaire, telle qu'elle vient d'être rapidement décrite, est un mécanisme fort complexe et certains de ses aspects méritent d'être examinés avec plus de précision.

C. Les chromosomes

a. La forme et le nombre des chromosomes

Les chromosomes métaphasiques représentent la forme la plus condensée du nucléofilament. Ils se réorganisent en prophase de chaque division cellulaire en nombre constant pour une espèce donnée.

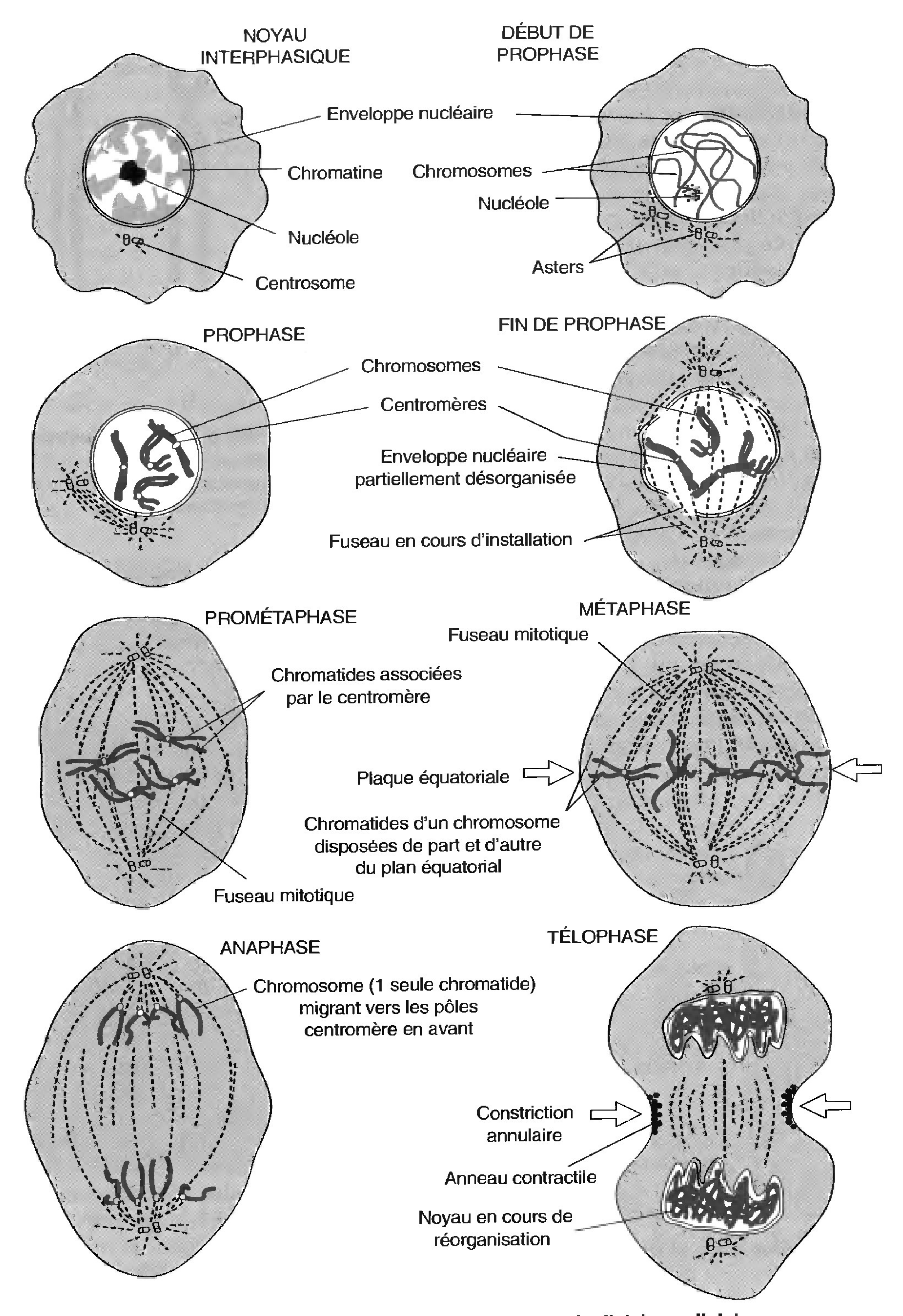


Fig. IX-29 : Représentation schématique des différentes phases de la division cellulaire.

Un chromosome métaphasique est formé par deux chromatides réunies au niveau d'un **centromère** *(fig. IX-30)* encore appelé **constriction primaire**, car à ce niveau le diamètre est généralement plus réduit; les **bras** sont situés de part et d'autre de ce centromère. Une seconde constriction peut exister, c'est alors la **constriction secondaire** qui, généralement localisée plus près d'une extrémité, délimite un *satellite. C'est au niveau de ces constrictions secondaires que se rencontrent les organisateurs nucléolaires.*

On reconnaît les chromosomes par leur forme (en V, en bâtonnet, punctiforme), la présence éventuelle d'un satellite, la position du centromère; lorsque celui-ci sépare des bras d'importance égale, le chromosome est *métacentrique (fig. IX-31, A)*, lorsque les bras sont inégaux, il est *acrocentrique* (B), lorsque la constriction primaire est proche d'une extrémité, il est *télocentrique* (C).

Comme nous l'avons déjà vu (p. 169), toutes les cellules provenant d'un même individu ont le même nombre de chromosomes et toutes les cellules provenant d'individus différents appartenant à la même espèce possèdent ce même nombre de chromosomes; c'est *le nombre chromosomique*, caractéristique de l'espèce.

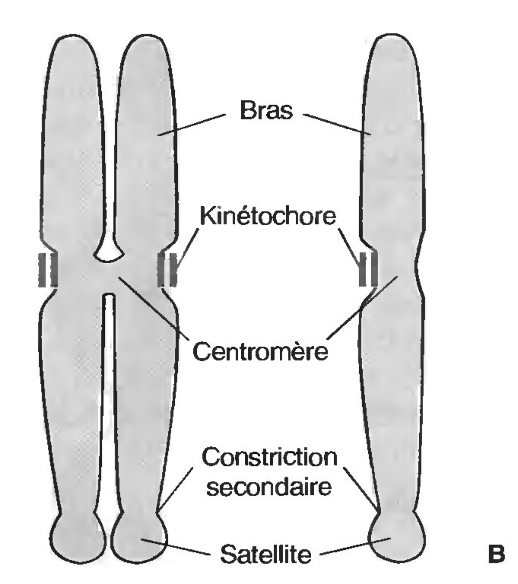


Fig. IX-30: Représentation schématique d'un chromosome.
A) En métaphase.
B) En anaphase.

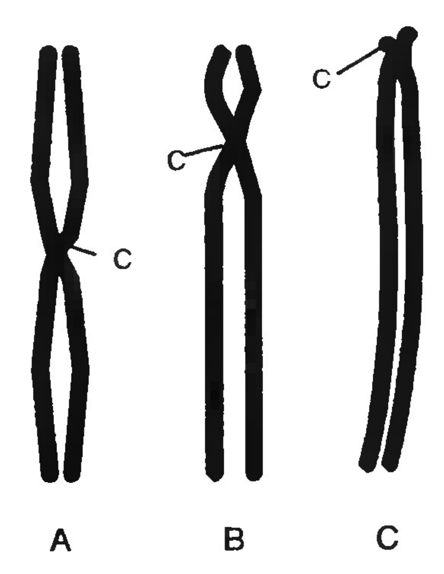


Fig. IX-31: Différentes positions du centromère.
A) Chromosome métacentrique.
B) Chromosome acrocentrique.
C) Chromosome télocentrique.

Chez les organismes supérieurs, lorsque ces chromosomes sont identifiés par leur forme, leur taille, la présence éventuelle de satellite, il est possible de les grouper par paires; chez l'homme par exemple il y a dans chaque cellule somatique 23 paires de chromosomes: le nombre chromosomique de l'espèce humaine est n = 23. Comme nous l'avons vu les cellules somatiques proviennent toutes, par une importante suite de divisions cellulaires du type de celle que nous venons d'étudier, d'une cellule œuf, le zygote, formé au moment de la fécondation par l'union des deux gamètes, mâle et femelle: elles sont donc toutes *diploïdes.*

Des modifications du nombre des chromosomes peuvent se produire naturellement ou être provoquées par l'utilisation de drogues. La cellule peut alors contenir un triple jeu de chromosomes (elle est alors *triploïde*) voire un quadruple (elle est *tétraploïde*). D'une façon plus générale on parle de ***polyploïdie*** pour qualifier les cellules qui possèdent un jeu multiple de chromosomes.

L'identification des chromosomes et leur groupement par paires obtenus à partir de documents photographiques permettent d'établir le *caryotype* de l'espèce (voir p. 172 un exemple de caryotype, celui de l'espèce humaine). La connaissance de ce caryotype

présente un intérêt pratique ; il permet de détecter très précocement, par prélèvement de cellules embryonnaires, des anomalies du nombre chromosomique susceptibles d'entraîner de graves troubles fonctionnels ou des malformations ; la plus célèbre de ces anomalies est la trisomie 21 ou mongolisme (le chromosome numéro 21 du caryotype humain figurant en trois exemplaires dans chaque cellule diploïde de l'individu).

b. L'organisation ultrastructurale des chromosomes

Observé en microscopie électronique à balayage, le chromosome métaphasique apparaît hérissé de boucles plus ou moins régulières correspondant aux multiples reploiements d'une fibre de 40 à 50 nm de diamètre *(fig. IX-32)*.

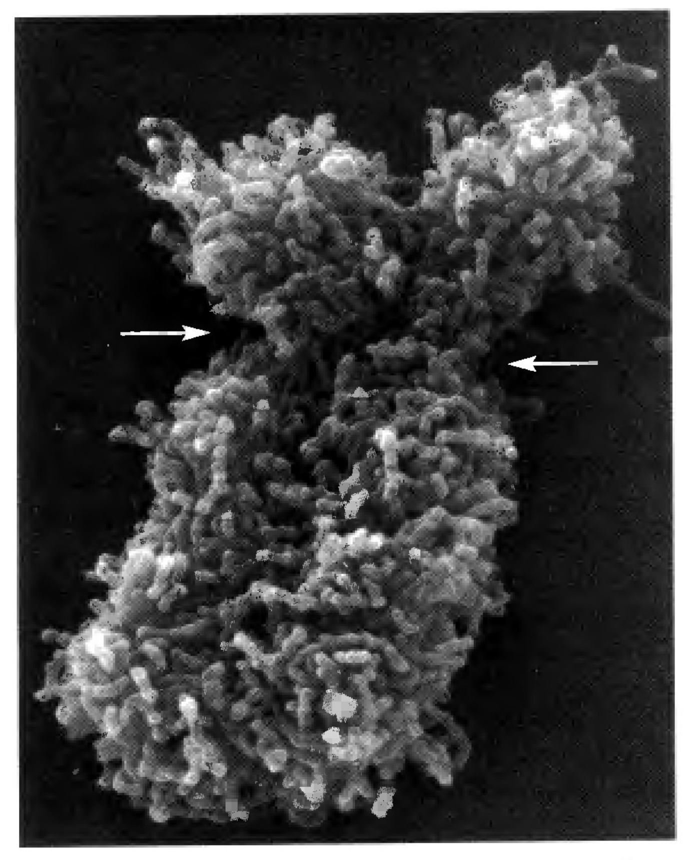


Fig. IX-32 : Chromosome métaphasique observé en microscopie électronique à balayage.
Les flèches indiquent la position des centromères.
G. x 34000. *(Reproduit de K. R. UTSUMI. Studies on the structure of chromosomes II. Chromosome fibers as revealed by scanning electron microscopy. Cell Struct Funct 1981 ; 6 : 395-401.)*

L'observation en microscopie électronique à transmission ne permet pas de reconstituer l'organisation du chromosome qui apparaît, sur les coupes ultrafines, comme une structure finement granulaire ; elle permet cependant de mettre en évidence, sur chaque chromatide, de chaque côté du centromère, des structures discoïdales, ***les kinétochores*** *(fig. IX-33)*. Chaque kinétochore, dont le diamètre varie, selon les organismes, entre 0,2 et 2 µm, apparaît généralement comme une structure en plateau formé par trois plaques : une interne et une externe, fibrillaires et denses, séparées par une couche médiane, transparente aux électrons et traversée de nombreuses fibres joignant les couches interne et externe ; à l'extérieur de la plaque externe une fine couche fibreuse, la corona.

Au point de vue fonctionnel, le kinétochore apparaît comme un ensemble de domaines organisés autour de l'ADN centromérique *(fig. IX-34, A)*, chaque domaine étant constitué par un groupe de protéines capables de s'associer aux microtubules, de « *capturer* » les microtubules issus du centrosome. Le nombre de ces protéines est très variable : une seule chez la levure formant une seule « *unité de capture* », plusieurs domaines chez les mammifères constitués chacun par plusieurs unités protéiques. Les plaques visibles en microscopie électronique peuvent être interprétées comme des tranches successives réalisées dans une fibre chromatinienne reployée et recouverte localement de protéines *(fig. IX-34, B)* ; ce reploiement, intervenant au cours de la

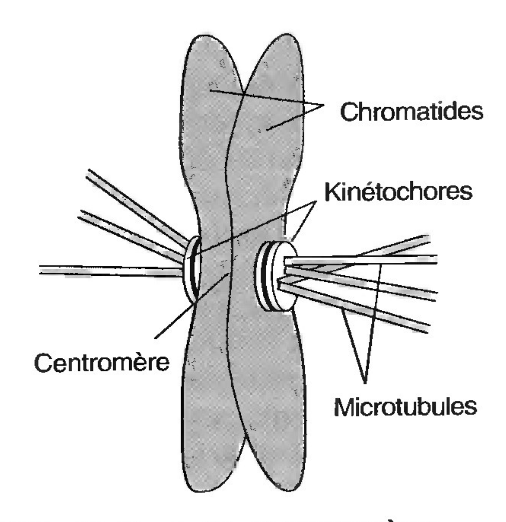


Fig. IX-33 : Kinétochores et centromères.

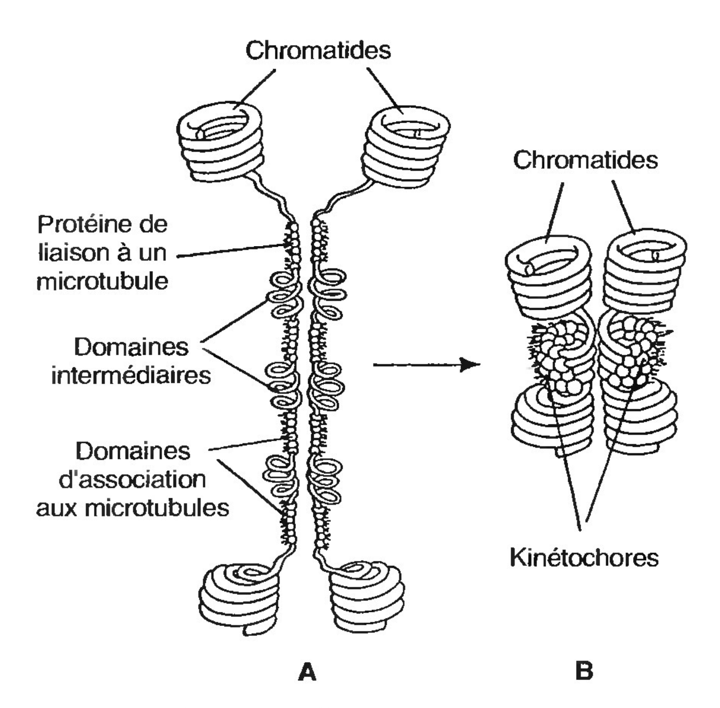


Fig. IX-34 : Un essai d'interprétation du complexe centromère-kinétochore.

A) En phase G_2 l'ADN centromérique, constitué par des séquences répétées, est plus ou moins déployé ; il est associé localement à des groupes de protéines qui correspondent chacune à une unité de liaison à un microtubule.

B) L'espacement de ces ensembles protéiques sur le nucléofilament est tel que lorsque les chromosomes se condensent, l'enroulement plus important de l'ADN entraîne leur regroupement au même niveau, ce qui forme les plaques kinétochoriales.

(D'après B.R. BRINKLEY, I. OUSPENSKI et R. ZINKOWSKI. Structure and molecular organization of the centromere-kinetochore complex. Trends Cell Biol 1992 ; 2 : 15-21.)

condensation du chromosome, est tel qu'il conduit à disposer au même niveau les unités de capture.

D'autres protéines ont également été identifiées au niveau des kinétochores : protéines induisant la nucléation de microtubules en prométaphase, protéines motrices, ATPases... Certaines de ces protéines jouent un rôle essentiel dans le déroulement de la mitose en réglant la succession de ses phases.

La chromatine du centromère est une zone *riche en séquences répétées* (ADN hautement répétitif, par séquences de 171 pb), où se situent très peu de gènes, très résistante à l'action des nucléases. On ignore précisément comment les chromatides sont maintenues associées à ce niveau et quel mécanisme permet leur séparation brutale au début de l'anaphase. Plusieurs hypothèses ont été formulées. 1) L'ADN du centromère ne serait pas répliqué en phase S ; il le serait seulement en fin de métaphase au cours d'une période de réplication tardive. 2) À ce niveau les chromosomes se seraient dupliqués normalement en phase S, mais les chromatides resteraient enchevêtrées ; des topo-isomérases, couperaient les brins en fin de métaphase. 3) Des protéines non histones, mises en évidence récemment, les cohésines, assureraient la liaison entre les deux chromatides.

Aucun argument ne permet actuellement de trancher entre ces diverses hypothèses.

La transformation d'un chromosome interphasique largement étendu dans le nucléoplasme en un chromosome métaphasique court et massif résulte d'une réorganisation du nucléofilament dont les modalités ne sont pas encore parfaitement comprises.

L'analyse de chromosomes métaphasiques isolés montre qu'ils sont constitués d'ADN, des cinq histones (c'est-à-dire les deux composants de la fibre de 30 nm de la chromatine interphasique) et de diverses protéines, qualifiées de non histones, parmi lesquelles se rencontrent très vraisemblablement les constituants de la matrice nucléaire interne et les enzymes qui lui sont associées.

La première étape de cette condensation chromosomique est une hyperphosphorylation des histones H_I et H_3 ; ce sont ces protéines ainsi transformées qui permettent de réorganiser le nucléofilament.

Des extractions sélectives de protéines ont été réalisées sur des chromosomes isolés et l'observation de ceux-ci en microscopie électronique, après un étalement sur grille, permet d'apporter quelques intéressantes informations.

Après élimination des protéines non histones par des solutions salines diluées, le chromosome est complètement désorganisé et seul le nucléofilament, sous forme d'une fibre de 11 ou 30 nm selon l'importance de la dissociation, est observé. Il y a en quelque sorte un retour à l'état interphasique.

Après élimination des histones, obtenue en traitant les chromosomes par des solutions

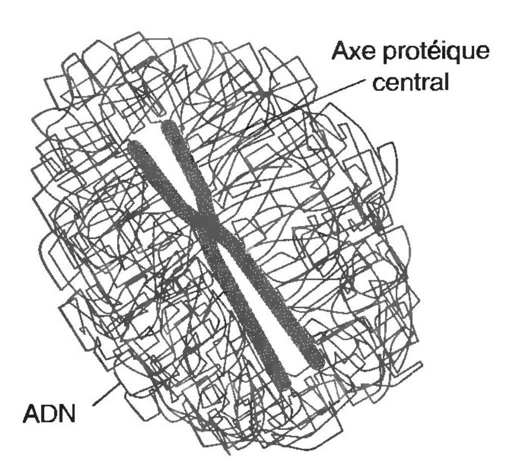


Fig. IX-35 : Aspect d'un chromosome métaphasique après élimination des histones.

polyanioniques susceptibles d'entrer en compétition avec les protéines basiques, la silhouette des chromatides persiste sous forme d'axe central dense autour duquel rayonnent les multiples boucles d'un filament apparemment ininterrompu de 3 à 4 nm de diamètre, la molécule d'ADN *(fig. IX-35)*.

On peut en conclure que l'axe chromosomique autour duquel s'organise le nucléofilament de 30 nm est constitué par les protéines non histones.

Ce sont probablement les mêmes protéines qui assurent la liaison nucléofilament-axe chromosomique et la liaison domaine chromatinien-matrice interne du noyau interphasique.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la structure spatiale de l'ensemble; deux seulement seront présentés.

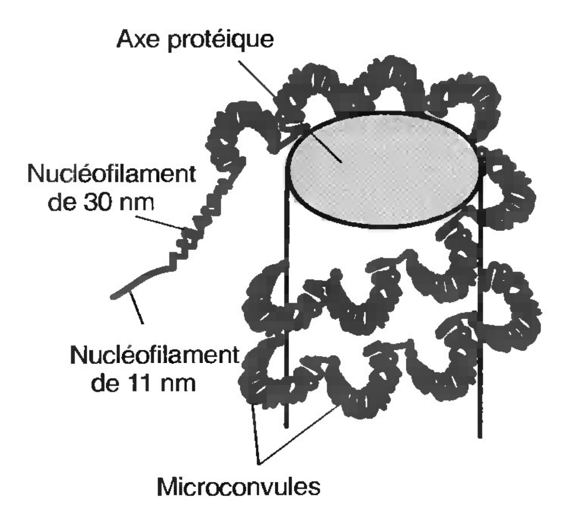


Fig. IX-36 : Organisation d'un chromosome par reploiement du nucléofilament en microconvules.

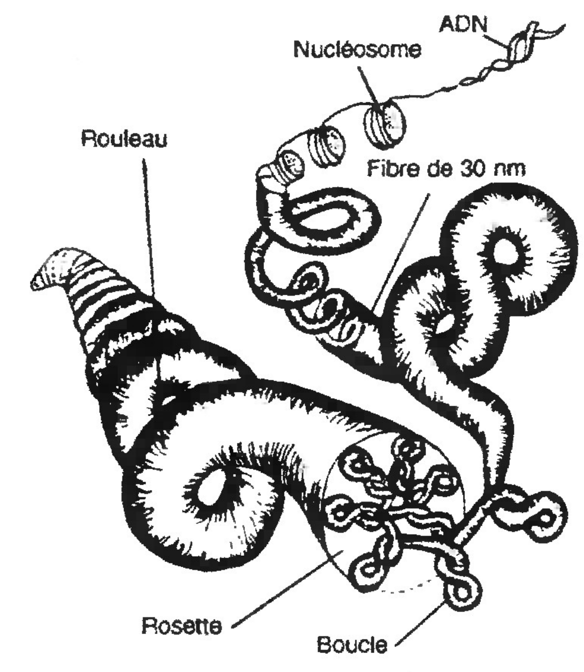


Fig. IX-37 : Organisation du chromosome par reploiement du nucléofilament en rosettes.

La molécule d'ADN s'enroule autour du cœur protéique pour constituer le nucléosome ; ce filament de 11 nm se dispose en hélice pour former la fibre de 30 nm ; celle-ci se reploie en boucles qui s'organisent elles-mêmes, par six, en une rosette, puis 30 de ces rosettes s'associent en un rouleau ; le chromosome mitotique lui-même est une succession de rouleaux.

(D'après J. FILIPSKI et al. *1990.)*

Dans le premier, le nucléofilament de 30 nm d'abord agencé en boucles de 20 000 à 100 000 paires de nucléotides (les microconvules de 300 nm) s'enroule en hélice autour de l'axe protéique *(fig. IX-36)*.

Dans le second, le filament de 30 nm s'organise en boucles de 50 000 paires de bases, qui elles-mêmes s'organisent par six en rosettes. Trente de ces rosettes s'enroulent formant un rouleau et une hélice de rouleaux correspond au chromosome tel qu'il apparaît en microscopie photonique *(fig. IX-37)*.

D. L'agencement des chromosomes en plaque équatoriale

Cet agencement des chromosomes en plaque équatoriale est capital puisque c'est lui qui prépare, en orientant les chromatides sœurs vers les pôles fusoriaux opposés, la formation de deux lots identiques de chromosomes.

Le phénomène, très rapide, est fondé sur *l'interaction des microtubules constitués à partir des centrosomes et des kinétochores.* En effet, les chromosomes dépourvus de kinétochores ne se lient pas au fuseau et ne sont pas répartis entre les deux lots chromosomiques.

Les kinétochores ont une double activité. D'une part ce sont des centres organisateurs de microtubules, comme on peut le montrer en plaçant *in vitro* des chromosomes dans un milieu riche en tubulines, mais des centres organisateurs semble-t-il peu efficaces dans l'environnement cellulaire. D'autre part, ce sont, comme nous l'avons vu, des structures qui présentent l'aptitude à s'associer aux extrémités + des microtubules polaires avec lesquels ils établissent des liens spécifiques; le nombre de microtubules ainsi retenus est variable *(fig. IX-38)*, un microtubule par chromosome chez la levure, 40 environ par chromosome chez l'homme, puisqu'il dépend du nombre de protéines de capture (voir ci-dessus).

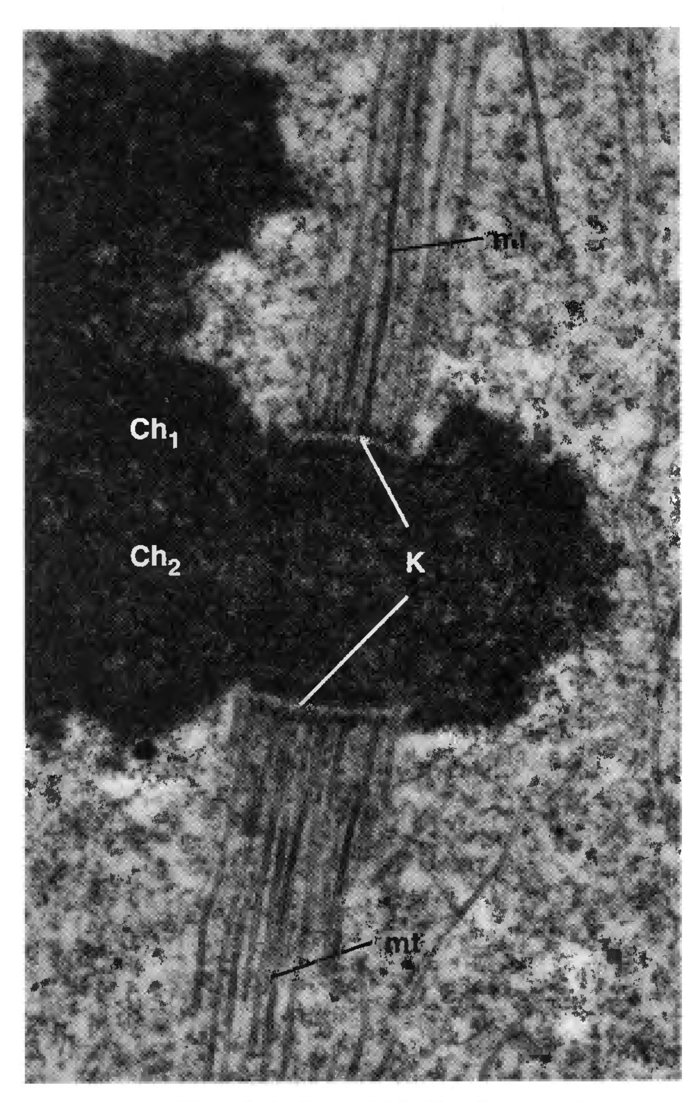


Fig. IX-38: Microtubules et kinétochores chez une algue.
La cellule est en métaphase, les deux chromatides Ch_1 et Ch_2 sont toujours associées au niveau du centromère. De part et d'autre de celui-ci, les kinétochores (K) sont bien visibles (un par chromatide). Ils sont liés à des faisceaux de microtubules (mt) issus de pôles opposés. G. x 31 000.
(Reproduit de M.J. SCHIBLER et J.D. PICKETT-HEAPS. The kinetochore fiber structure in the acentric spindles of the green alga Œdogonium. *Protoplasma 1987; 137: 29-44.)*

Les microtubules associés au kinétochore ont tendance à tirer celui-ci vers le pôle dont ils proviennent. La traction exercée sur le kinétochore est proportionnelle à la distance le séparant du pôle: plus il en est éloigné, plus la force est intense; plus il s'en rapproche, plus elle diminue; le microtubule le plus court, donc associé au kinétochore de la chromatide la plus proche d'un diplosome, s'allonge par adjonction de sous-unités α-β à son extrémité kinétochoriale; le microtubule le plus long relié à la chromatide la plus éloignée d'un aster se dépolymérisant au niveau de ce dernier. En fait, la plaque équatoriale correspond à un état d'équilibre entre deux tensions exercées à partir des pôles opposés *(fig. IX-39 et 40)*.

Tous les microtubules ne sont pas cependant associés aux kinétochores; certains passent entre les chromosomes: *ce sont les microtubules polaires.* Ils dépassent souvent la zone médiane, ce qui conduit au chevauchement des deux demi-fuseaux. À ce niveau ces microtubules polaires peuvent être associés par des protéines de liaison.

E. *L'anaphase: la séparation des chromosomes et l'ascension vers les pôles*

Dès que les liens maintenant les chromatides associées au niveau du centromères se rompent, les chromosomes-fils se séparent, chacun gagnant l'un des pôles; la vitesse du déplacement est comprise entre 0,01 et 0,1 $\mu m.s^{-1}$.

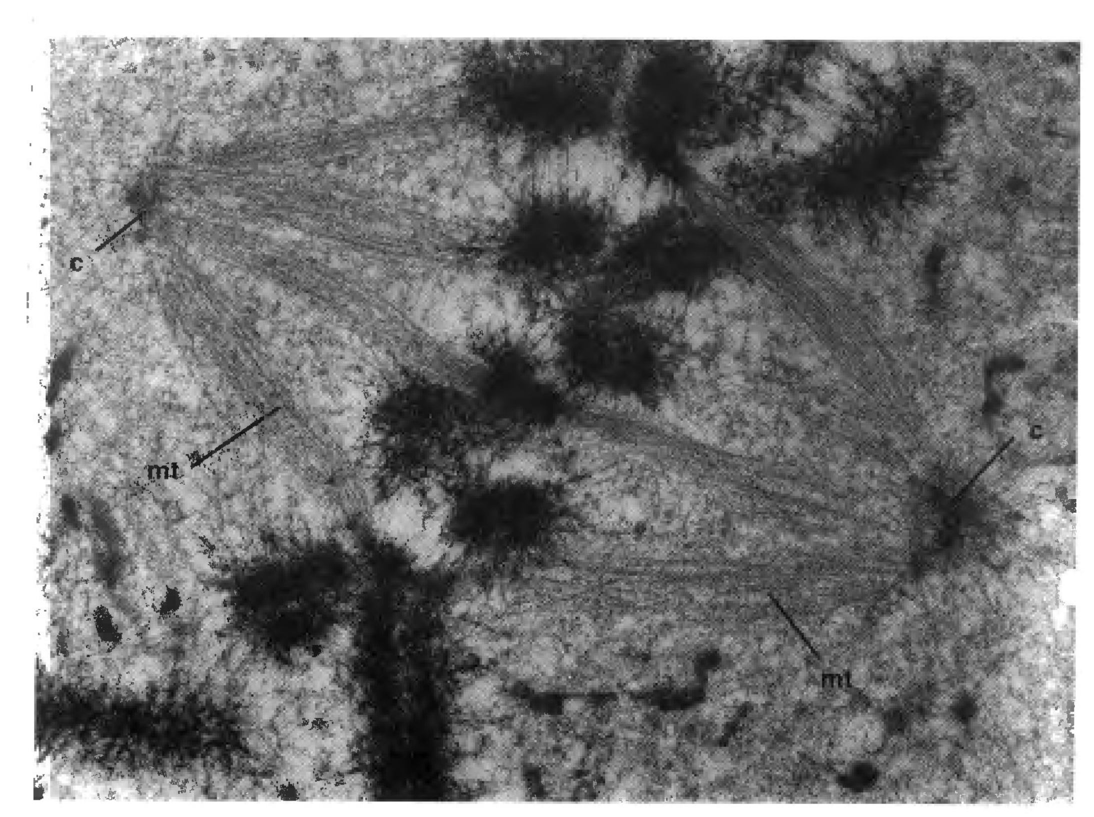


Fig. IX-39 : Plaque métaphasique.
Coupe épaisse (0,25 µm) dans une cellule animale, observée en microscopie électronique par transmission à haut voltage. Notez les faisceaux de microtubules (mt) joignant les centrioles (c) aux kinétochores des chromosomes.
G. x 9 050.
(Reproduit de C.L. RIEDER. Formation of the astral mitotic spindle : ultrastructural basis for the centrosome-kinetochore interaction. Electron Microsc Rev 1990; 3 : 269-300.)

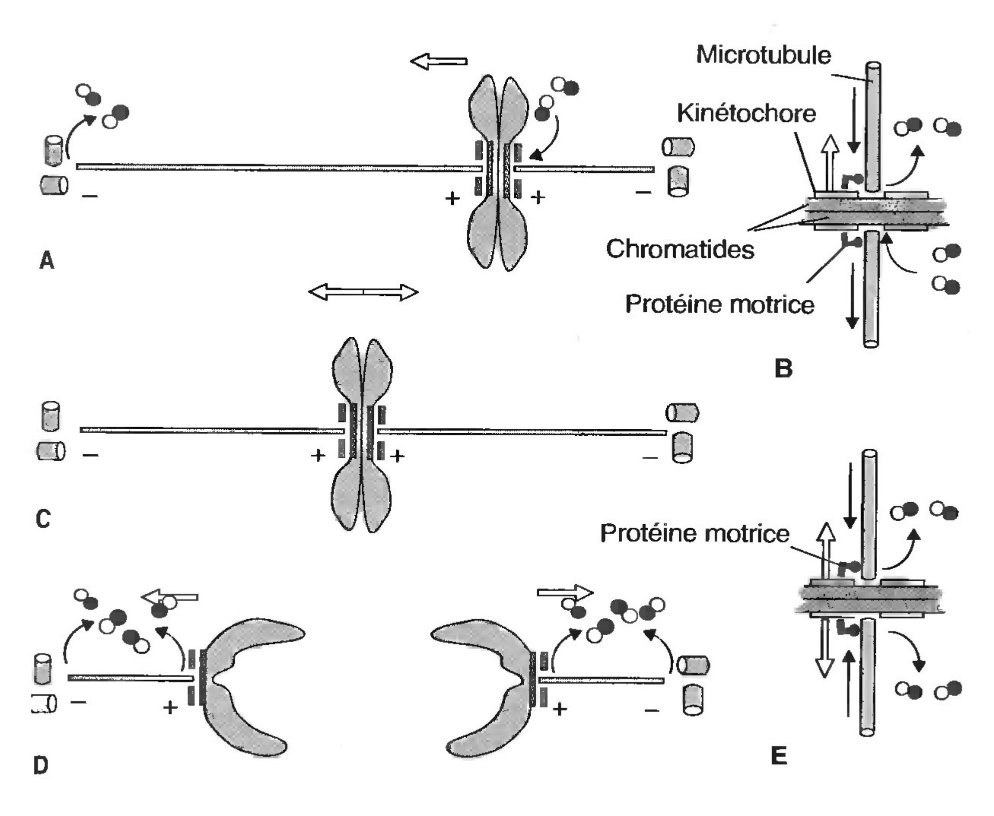


Fig. IX-40 : Schématisation des forces permettant la réalisation de la plaque équatoriale et la montée anaphasique.

En prométaphase, les chromosomes sont soumis à un ensemble de forces inversement proportionnelles à la distance séparant les centromères des centrioles ; la résultante de ces forces déplace les deux chromatides associées vers le centre de la cellule (A) ; ce mouvement est dû à l'intervention de protéines motrices d'une part, à la polymérisation ou à la dépolymérisation des microtubules d'autre part (B). Lorsque les forces se compensent, le point d'équilibre est atteint, le chromosome est alors disposé sur la plaque équatoriale (C). Lorsque les centromères se séparent, les chromosomes se dirigent vers les pôles (D) ; ce mouvement est dû à une dépolymérisation de tous les microtubules d'une part, à l'intervention de protéines motrices d'autre part (E).
Les petites flèches indiquent le mouvement apparent des microtubules par rapport aux kinétochores, les grosses flèches le mouvement des chromatides.

On ignore la nature exacte du mécanisme permettant la séparation des chromatides. *C'est un processus régulé,* car **il n'intervient que lorsque tous les chromosomes sont correctement disposés en plaque équatoriale** ; il est probablement dû à l'activation d'enzymes hydrolysant spécifiquement les protéines associant les chromatides, *les cohésines.*

Le déplacement des chromosomes provient du raccourcissement par dépolymérisation des microtubules En effet, lorsque des cellules en anaphase sont traitées par un inhibiteur de cette dépolymérisation, le taxol par exemple, le mouvement s'arrête.

Pour ce qui concerne le site de cette dépolymérisation, il semble bien qu'il se situe à la fois au niveau des asters et à celui des kinétochores. Au niveau de ces derniers, en effet on a pu marquer par un faisceau lumineux une zone précise de microtubules préalablement colorés (encadré, *fig. IX-41, A*) ce qui a permis de constater que le désassemblage se localisait également à proximité du chromosome, c'est-à-dire à l'extrémité + *(fig. IX-41, B)*. Le mécanisme lui-même, qui permet la dépolymérisation tout en assurant le maintien de l'association kinétochore-microtubule, n'est pas connu *(fig. IX-42)*.

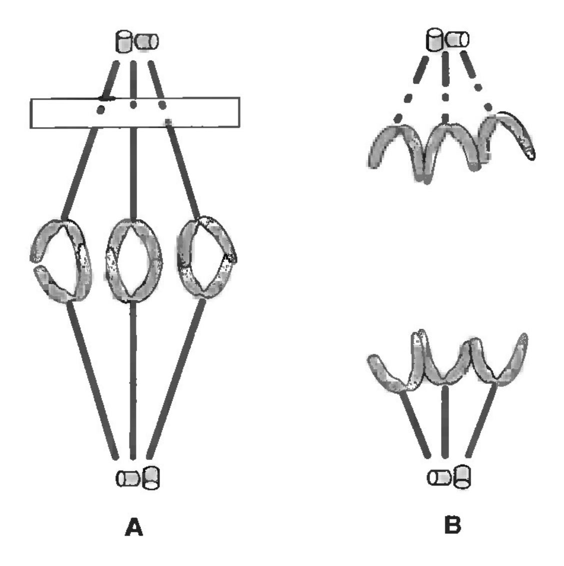


Fig. IX-41 : Le marquage d'une région précise du fuseau à l'anaphase permet de montrer que la dépolymérisation se situe, en partie au moins, près des kinétochores.
(D'après G.J. GORBSKY, P.J. SAMMAK et G.G. BORISY, 1987.)

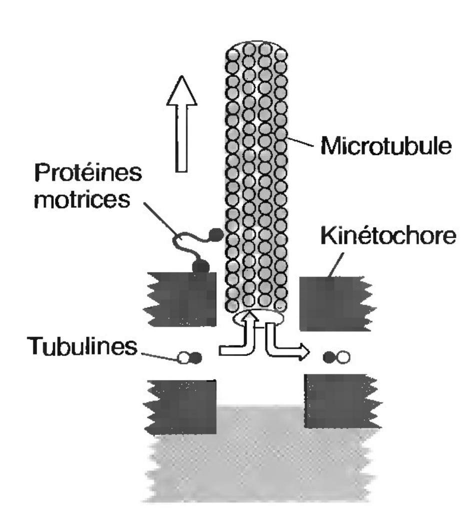


Fig. IX-42 : Représentation schématique du kinétochore en anaphase.

On a pu également mettre en évidence à proximité ou au niveau des kinétochores des protéines motrices (comme la dynéine, la kinésine) dont le rôle pourrait être d'assurer le déplacement du kinétochore par rapport à l'extrémité microtubulaire ; *on a même démontré que le sens du mouvement pouvait être inversé par phosphorylation de ces protéines.* Le mécanisme exact demeure cependant encore partiellement incompris.

La séparation des chromosomes-fils est encore favorisée par une élongation des microtubules polaires. Ceux-ci incorporent de nouvelles tubulines par nucléation et des protéines motrices assurent le glissement des microtubules issus d'un pôle par rapport à ceux issus de l'autre ; la forme du fuseau change, il devient plus ovale ce qui a pour conséquence d'accentuer la séparation entre les deux lots chromosomiques *(fig. IX-43)*.

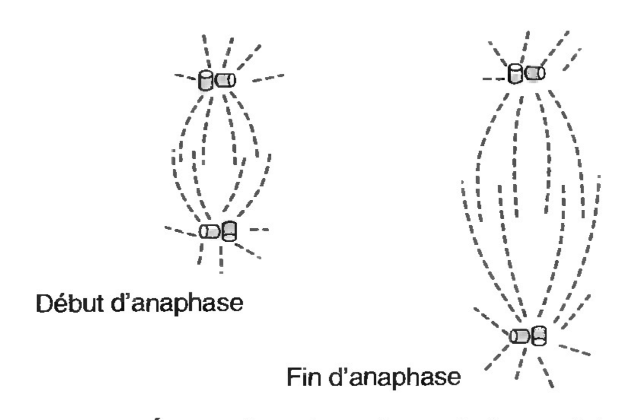


Fig. IX-43 : Élongation des microtubules polaires en fin d'anaphase.

Au terme de ces déplacements chaque cellule a reçu la même information génétique. Les chromosomes tassés aux pôles du fuseau commencent à se décondenser et l'enveloppe nucléaire se reconstitue.

F. *L'enveloppe nucléaire : désorganisation et reconstitution*

La dissociation de l'enveloppe nucléaire est la conséquence d'une phosphorylation des lamines qui intervient pendant la prophase ; sa reconstitution correspond au phénomène inverse, la déphosphorylation.

On peut mettre en évidence ce rôle déterminant des lamines à l'aide d'anticorps antilamines injectés dans des cellules à des périodes différentes de leur cycle.

Si l'injection est faite en phase G_2 ou en début de prophase, la cellule entre en mitose et celle-ci se déroule normalement jusqu'à la télophase ; à ce moment cependant, l'enveloppe nucléaire ne se reconstitue pas. On en conclut que les anticorps se sont liés aux lamines et que cette association rend les molécules inaptes à jouer leur rôle, celui d'un intermédiaire indispensable entre la chromatine et l'enveloppe nucléaire.

Si la micro-injection est faite à l'aide d'anticorps auxquels on a lié un colorant fluorescent, on peut suivre le devenir de ces molécules. Si elle est faite dans le cytoplasme en G_2, les anticorps restent dans le cytoplasme, ils ne peuvent se lier à l'antigène puisque celui-ci est protégé par l'enveloppe nucléaire. Si elle a toujours lieu en G_2, mais dans le noyau, les anticorps demeurent dispersés dans le nucléoplasme, les lamines protégées par la chromatine restant inaccessibles. Si elle a lieu en prométaphase, métaphase ou anaphase, les anticorps, qui ont pu atteindre leur cible, sont identifiables dans le cytoplasme où sont dispersées les lamines. Si la même opération a lieu en télophase, les complexes lamines-antilamines apparaissent associés aux chromosomes.

On déduit de ces expériences que, en début de prophase, la phosphorylation des lamines modifie leurs propriétés, ce qui a pour conséquence de rompre les associations entre les polypeptides, entre ces derniers et la membrane nucléaire interne, entre la lamina, les protéines de liaison (LAP et LBR) et la chromatine. Cette dernière est libérée et commence à se condenser tandis que l'enveloppe nucléaire se vésiculise progressivement, n'étant plus maintenue par le squelette interne que constitue la lamina *(fig. IX-44)*.

En télophase le phénomène inverse se produit ; la déphosphorylation des lamines et des protéines de liaison permet leur réassociation aux chromosomes, d'abord au niveau des télomères ; dans un second temps, la complémentarité structurale des polypeptides permet la reconstitution de proche en proche de la lamina et sa réassociation avec les vésicules de l'enveloppe nucléaire encore dispersées dans le cytoplasme. L'enveloppe nucléaire et la lamina sont ainsi reconstituées et le noyau interphasique est progressivement restructuré.

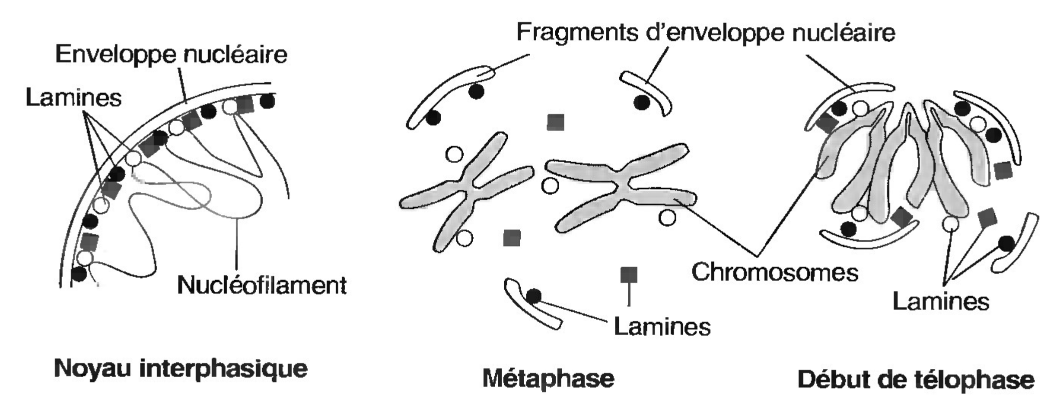


Fig. IX-44 : Rôle des lamines et des protéines de liaison (LAP et LBR/p58) dans la désorganisation et la reconstitution de l'enveloppe nucléaire.

G. La cytodiérèse

Ce phénomène, qui débute en anaphase et se poursuit en télophase, conduit à la bipartition des cellules filles.

Le phénomène débute par la formation sous le plasmalemme, *dans le plan de la plaque équatoriale*, d'un anneau contractile *(fig. IX-45)*. Les tests immunocytochimiques, réalisés à l'aide d'anticorps marqués par la fluorescéine, ont montré que dans cet anneau se rencontraient des microfilaments d'actine et de myosine (voir p. 277). C'est donc l'interaction de ces deux composants qui permet la formation de l'invagination.

La progression de cette invagination, généralement très rapide (quelques minutes), conduit d'abord à la compression dans la zone centrale des derniers microtubules polaires, puis à la fusion des plasmalemmes et à la séparation définitive des deux cellules.

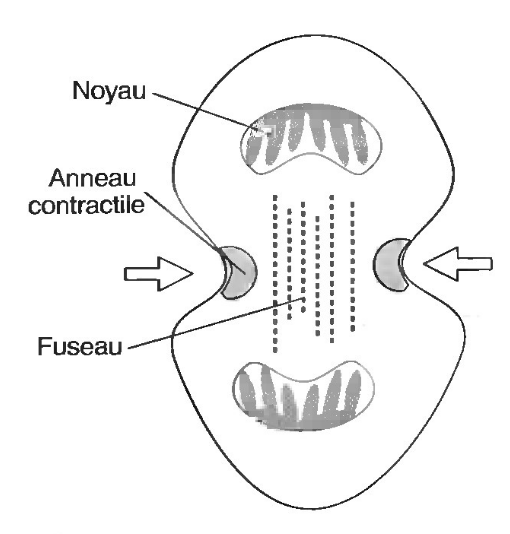


Fig. IX-45 : Anneau contractile dans une cellule animale.

H. La mitose dans les cellules végétales

Deux des caractères fondamentaux qui distinguent les cellules végétales des cellules animales vont avoir des répercussions importantes sur le déroulement de la division cellulaire : l'absence de centrosome* et la présence d'une paroi.

Le premier signe de l'entrée en mitose d'une cellule végétale se repère au niveau des microtubules. Ceux constituant le cytosquelette cortical se dépolymérisent tandis que d'autres s'organisent en une couche annulaire sous la membrane plasmique, en règle générale dans la région médiane de la cellule : ***c'est l'anneau ou bande préprophasique*** *(fig. IX-46, A et E)*. Par sa position, *il prédétermine le plan dans lequel s'effectuera la division cellulaire*, la localisation de la plaque équatoriale et la cytodiérèse.

Les microtubules de la bande préprophasique disparaissent ensuite et le fuseau se met en place. Il n'y a pas de centrosomes et il semble bien que les microtubules s'organisent à partir de l'enveloppe nucléaire *(fig. IX-46, B et F)* en un fuseau bipolaire sans aster, les mitoses sont dites *anastrales (fig. IX-46, C et D)*. La suite de la division est, jusqu'en télophase, comparable à ce que nous avons rencontré chez les animaux.

À la télophase, les microtubules polaires résiduels forment au centre de la cellule une sorte de colonne, *le phragmoplaste (fig. IX-47, A et photo de couverture)*. Ces microtubules canalisent de très nombreuses vésicules, la plupart d'origine golgienne, vers le centre de la cellule ; le déplacement de ces vésicules est dû à leur association à des protéines motrices *(fig. IX-47, D)*, comme la kinésine. L'accumulation puis la fusion de ces vésicules qui contiennent les précurseurs des polysaccharides pariétaux conduisent à la formation d'une structure discoïde, *la plaque cellulaire (fig. IX-47, B)*. Autour de cette plaque, les microtubules s'assemblent et se désassemblent en position de plus en plus périphérique, dirigeant de nouvelles vésicules vers les bords de la plaque cellulaire qui s'accroît ainsi de manière *centrifuge (fig. IX-47, C)*. Lorsque cette plaque atteint les parois latérales de l'ancienne cellule, la bipartition est réalisée.

Au cours de cette formation, la membrane des vésicules qui fusionnent constitue le nouveau plasmalemme. Quant aux éléments du réticulum endoplasmique qui se trouvent

* Des structures centriolaires existent chez certains champignons et algues mais le déroulement de la division cellulaire est, chez ces organismes, souvent très différent de ce que nous venons de voir chez les cellules animales.

Bande préprophasique

A B C D E F

Fig. IX-46 : **Anneau préprophasique (A et E), organisation du fuseau autour de l'enveloppe nucléaire (B et F), métaphase et anaphase anastrales (C et D) dans une cellule végétale.**
(E et F, marquage des tubulines par un anticorps fluorescent ; G. X : E, 1 500 ; F, 2 000 ; *reproduit de J. KUBIAK, Origin of the mitotic spindle in onion root cells. Protoplasma 1986 ; 130 : 51-56*).

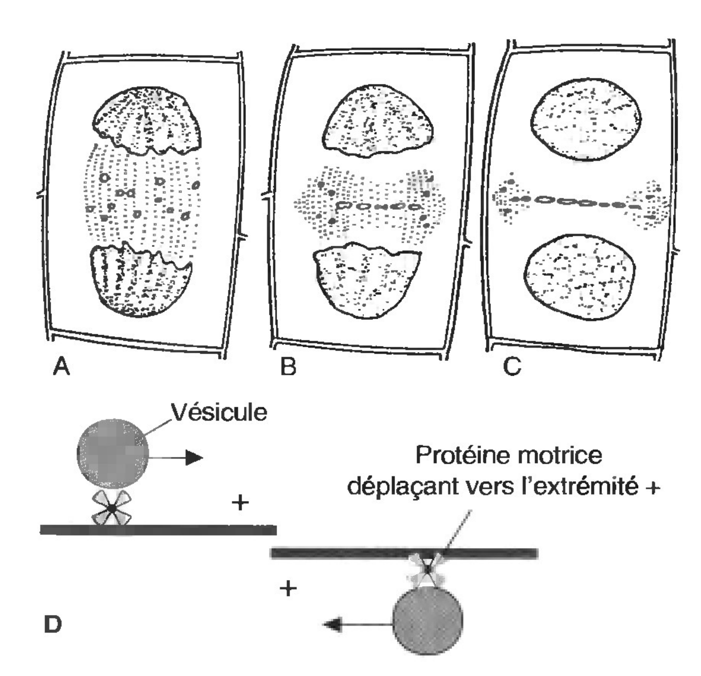


Fig. IX-47 : **Cytodiérèse dans une cellule végétale.**

emprisonnés au cours de l'édification de la plaque cellulaire, ils sont les futures communications intercellulaires, les futurs **plasmodesmes.**

I. La régulation du cycle cellulaire

Nous avons vu (p. 381) que la vie de cellules en voie de division active se déroulait selon un cycle bien défini, caractérisé par une succession de phases, G_1, S, G_2, M, dont la durée et la chronologie sont bien établies.

La phase G_1 est une phase de synthèse dont la durée est très variable. Elle peut être pratiquement nulle, la synthèse d'ADN étant initiée dès la fin de la mitose. Les divisions se succèdent alors à un rythme extrêmement rapide. Cette suppression de la phase G_1 se produit dans des cellules très particulières, comme les œufs au début de leur segmentation. Dans ces cellules de très grande taille, il est vrai, le cytoplasme est riche en substances de réserves, précurseurs et métabolites divers ; il n'est alors pas nécessaire que la cellule produise ces molécules, ce qui confirme indirectement l'importance de G_1 dans le rétablissement d'une dimension cellulaire mini-

male préalable au déclenchement de la synthèse.

Certaines cellules voient la durée de leur phase G_1 augmenter progressivement au cours des cycles cellulaires successifs: la taille de la cellule croît sans qu'il y ait initiation de la phase S. Ce ralentissement progressif accompagne, en règle générale, la différenciation cellulaire, c'est-à-dire une spécialisation fonctionnelle. Les mitoses deviennent de plus en plus rares, une fois par an dans le cas des cellules hépatiques par exemple, voire nulles comme dans les cellules nerveuses, les neurones. On ne parle plus alors de phase G_1 mais de phase G_0 et l'on ne caractérise plus le noyau comme étant interphasique (c'est-à-dire entre deux phases du cycle cellulaire), on le dit *quiescent*. Pour certaines cellules, cette quiescence est définitive, d'autres par contre peuvent reprendre une activité mitotique; la sortie de la phase G_0 est alors beaucoup plus longue qu'une phase G_1 normale. Le contrôle de cette quiescence, donc celui de la différenciation, est complexe, dépendant des facteurs de l'environnement immédiat et, chez les organismes plus évolués, de corrélations internes dont l'étude sort du cadre de ce chapitre.

Entre 1960 et 1970, il devint évident que l'entrée en mitose est contrôlée par des facteurs diffusibles. En effet, lorsque des noyaux interphasiques isolés sont injectés dans des cellules en métaphase, leur chromatine se condense; de même, lorsqu'on fait fusionner une cellule en métaphase avec une cellule en interphase, le noyau de cette dernière se désorganise et la chromatine se condense. Le facteur diffusible responsable est appelé **MPF** *(Mitosis-Promoting Factor)*. On obtient des résultats comparables pour ce qui concerne le début de la phase S: la réplication peut être induite dans une cellule en phase G_1 par fusion avec une cellule en phase S.

Le cycle cellulaire est donc contrôlé par la cellule; le ou plus exactement les systèmes responsables de ce contrôle doivent activer les enzymes nécessaires au moment opportun et les désactiver lorsque le processus est achevé. Il faut également noter que, au cours du déroulement du cycle, un système enzymatique déclenchant un processus biologique ne doit entrer en action qu'après achèvement complet du processus précédent. Ainsi la réplication ne peut débuter que si la cellule a atteint la taille critique et la mitose ne peut commencer que lorsque le stock chromosomique est doublé: entrée en phase S et démarrage de la mitose sont donc des ***points de contrôle essentiels***. Ces points de contrôle permettent de réduire la fréquence des erreurs dans la division cellulaire puisqu'ils assurent l'enchaînement correct de processus extrêmement complexes.

Entrée en phase S et démarrage de la mitose sont les points de contrôle essentiels, les mieux connus car les plus étudiés. Ce ne sont cependant pas les seuls; il en existe un, par exemple, à la fin de l'assemblage du fuseau mitotique évitant le déclenchement prématuré de l'anaphase; de même, lorsqu'un chromosome métaphasique n'est relié qu'à un pôle du fuseau, un signal est envoyé, par des voies encore mal élucidées, et interrompt le déroulement du cycle.

Il faut également prendre en considération le fait que ce contrôle doit intégrer, surtout chez les organismes pluricellulaires, les signaux de l'environnement; s'il n'en est pas ainsi, la multiplication cellulaire est anarchique, ce peut être la cancérisation.

Dans les chapitres qui précèdent, nous avons vu à plusieurs reprises que le système le plus fréquemment utilisé pour contrôler (activer ou inhiber) une enzyme est la fixation d'un groupe phosphate. Ces groupes sont fixés par des enzymes spécifiques, ***les kinases***, qui les transfèrent à partir de l'ATP; ils peuvent ensuite être éliminés par d'autres enzymes, ***les phosphatases***.

Entre 1987 et 1990, on a effectivement établi que le cycle cellulaire est bien contrôlé par des phosphorylations; en effet, on a mis en évidence que le produit d'un gène appelé *CDC2* est un régulateur universel de l'entrée en mitose et de son déroulement.

Le produit de ce gène est une kinase, appelée d'abord $p34^{cdc2}$ puis CDC2. Cette enzyme est présente pendant tout le cycle cellulaire, sous sa forme simple et inactive; pour qu'elle devienne fonctionnelle et phosphoryle un sub-

strat, elle doit être associée à une autre protéine, une *cycline B*; ***c'est le complexe CDC2 + cycline B qui constitue le MPF***, c'est-à-dire une protéine kinase active, capable de provoquer la condensation de la chromatine, la dissociation de la lamina, la désorganisation de l'enveloppe nucléaire et la formation du fuseau lorsqu'elle est injectée dans une cellule en interphase.

Le terme de cycline est lié au mode particulier de formation de cette protéine pendant le cycle cellulaire. En effet, alors que CDC2 est constamment présent dans la cellule, la cycline B disparaît brusquement à la fin de la mitose puis recommence à être synthétisée pendant la phase G_1; elle s'accumule progressivement pendant les autres phases; lorsque sa concentration est suffisante, la mitose démarre.

Au cours de ces dernières années, le mécanisme s'est trouvé sensiblement compliqué. On a en effet découvert de nombreuses kinases de type $p34^{cdc2}$, toutes impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et toutes actives ***seulement lorsqu'elles sont associées à une cycline***; ce sont les **CDK** ***(Cyclin-Dependent-Kinase)*** dont le nombre de types connus s'accroît continuellement*: CDK2, CDK3, CDK4, CDK5... On a également mis en évidence d'autres cyclines que la B (cyclines A, E, C, D...) et compris qu'une même cycline peut activer différentes unités catalytiques (A-CDC2, A-CDK2, A-CDK3...) et qu'une même unité catalytique peut s'associer à différentes cyclines (CDK2-A, CDK2-D, CDK2-E...)

On pense actuellement *(fig. IX-48, A)* que les cyclines B et A, associées à CDK1 (CDC2), dont les quantités deviennent significativement importantes en phase G_2, contrôlent la transition $G_2 \rightarrow M$, que la cycline A associée à CDK2 régule la progression de la phase S, que la cycline E liée à CDK2 intervient dans la transition $G_1 \rightarrow S$. Quant aux différentes cyclines C et D, associées à différentes kinases, elles joueraient leur rôle au cours de la phase G_1. *Le déroulement du cycle cellulaire est donc régulé par les activations et les inactivations régulières de kinases cyclines-dépendantes réalisées dans un ordre défini (fig. IX-48, B)*. Toutefois, la périodicité de ces oscillations peut être modifiée puisque,

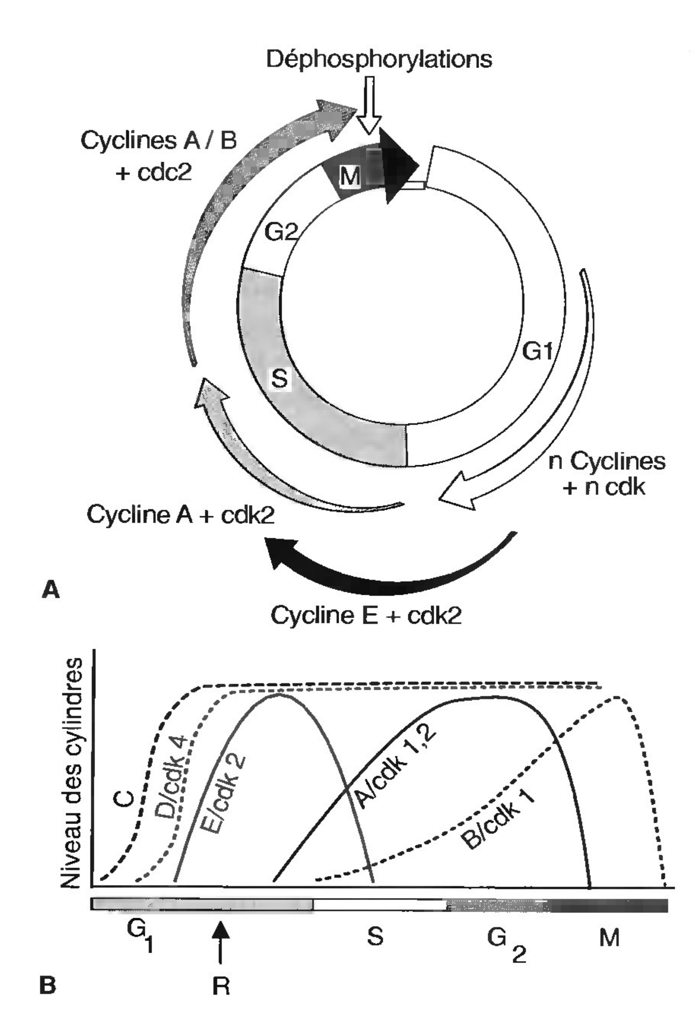


Fig. IX-48 : Cycle cellulaire et cyclines.
La régulation du déroulement du cycle cellulaire est assurée par l'intervention ordonnée de différentes kinases, chacune constituée par l'association d'une cycline et d'une unité catalytique (CDC ou CDK). Chacune de ces kinases agit sur des substrats définis ; l'ordre de leur intervention est déterminé par l'ordre de transcription des cyclines, c'est une régulation génétique. Les cyclines sont rapidement détruites ; les unités catalytiques demeurent sous forme inactive si elles ne sont pas associées à une cycline. Ce sont les kinases CDC2-A et surtout CDC2-B qui régulent la transition $G_2 \rightarrow M$ et le déroulement de la mitose.
(A : *D'après C.J. SCHERR. Mammalian G_1 cyclins. Cell 1993 ; 73 : 1059-1065.* B : *D'après M. A. FELIX et E. KARSENTI. La Recherche, 1994.)*

* Les CDK sont numérotées dans l'ordre de leur découverte; dans ces conditions, $p34^{CDC2}$ doit être appelée CDK1.

comme nous l'avons vu, certaines étapes ne peuvent pas être engagées avant que les précédentes soient totalement achevées.

En suivant l'évolution de la quantité de cycline B au cours de plusieurs cycles cellulaires *(fig. IX-49)*, on constate qu'il n'y a pas d'exacte superposition entre cette évolution et la durée d'activité du MPF: en effet, l'activité de celui-ci débute brusquement, c'est l'entrée en mitose, et s'interrompt tout aussi rapidement; par contre, la synthèse de la cycline s'étend sur une période relativement importante du cycle, débutant en phase G_1; quant à l'association des deux composants du MPF, elle est progressive durant les phases S et G_2. Quel est donc le mécanisme qui permet au complexe de devenir brusquement fonctionnel? En d'autres termes, quels sont les processus qui interviennent à ce point, contrôlant l'entrée en mitose?

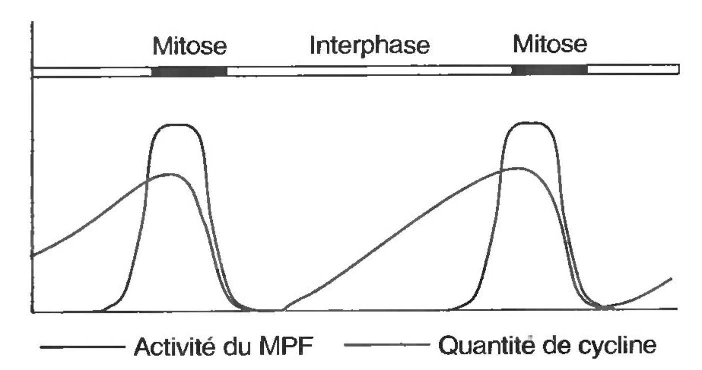


Fig. IX-49: Évolution comparée de l'activité du MPF et de la quantité de cycline B au cours de deux cycles cellulaires.

On a pu établir qu'au cours de sa formation le MPF est doublement phosphorylé; une première kinase (appelée CAK) fixe un phosphate sur un résidu thréonine et le complexe devient stable; une seconde kinase (WEE 1) associe un autre groupe phosphate à un résidu tyrosine, ce qui rend le complexe inactif: donc, ***un groupement phosphate se fixe sur un site activateur, l'autre sur un site inhibiteur, le MPF est inactif*** *(fig. IX-50)*. C'est au moment où doit se déclencher la mitose qu'une phosphatase spécifique (CDC25), activée dans un premier temps par une protéine régulatrice (l'activateur initial), élimine le groupe phosphate lié au site inhibiteur: *le MPF est alors fonctionnel (fig. IX-50)* et peut accrocher des groupes phosphates à divers substrats.

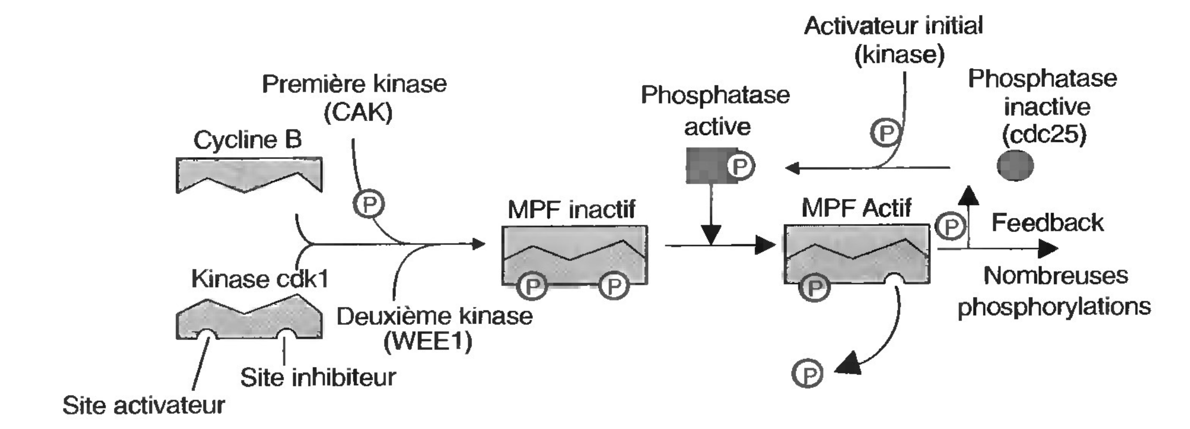


Fig. IX-50: Contrôle de l'entrée en mitose.

Le MPF *(Mitosis-Promoting Factor)* est formé par association d'une cycline (la cycline B) et d'une kinase (CDK1 = CDC2). Une première kinase (appelée CAK) stabilise le complexe par une phosphorylation de CDK1; une seconde kinase (WEE 1) le rend inactif. Sous cette forme le MPF s'accumule dans la cellule.

Le démarrage de la mitose est dû à la déphosphorylation partielle du MPF: le phosphate inhibiteur est éliminé par une phosphatase (CDC 25). Le MPF devient alors fonctionnel.

Cette phosphatase, CDC 25, est activée à un moment précis du cycle cellulaire par intervention d'une autre kinase, appelée ici « activateur initial », qui fixe un groupe phosphate sur l'enzyme inactive.

Les premières molécules fonctionnelles de MPF vont d'une part activer, par de nombreuses phosphorylations, les enzymes intervenant dans le déclenchement de la mitose, d'autre part activer à leur tour des phosphatases CDC 25. Cette boucle de régulation (*feedback*) permet alors une production intense de MPF fonctionnel à partir des complexes inactifs accumulés au cours des phases précédentes du cycle. Le processus mitotique est alors enclenché.

Au moment de l'entrée en mitose, de nombreuses phosphorylations de substrats interviennent; en conséquence, la quantité de protéines kinases nécessaire (de MPF) est importante. On explique cette hyperactivité enzymatique par *une boucle de régulation* de type *feedback*: les premières molécules de MPF fonctionnel produites (par intervention de l'activateur initial) sont capables elles-mêmes de phosphoryler les phosphatases; celles-ci sont alors de plus en plus nombreuses, retirant les groupes phosphates inhibiteurs sur un nombre de plus en plus élevé de CDK1 liés à la cycline B *(fig. IX-50)*; le processus devient « explosif ».

En ce qui concerne la destruction des complexes cycline-CDK, c'est celle du MPF qui est la mieux connue; elle résulte d'une déphosphorylation du site actif de la kinase par une phosphatase; le MPF se dissocie et la kinase est alors inactivée *(fig. IX-51)*. La destruction de la cycline est ensuite réalisée par le système protéasome-ubiquitine (p. 264). Les cyclines sont d'abord marquées en s'associant par liaison covalente avec les petites protéines appelées *ubiquitines*; ces petites molécules sont, rappelons-le, des sortes d'étiquettes signalant « *molécule à détruire* ». Les cyclines ainsi identifiées sont reconnues par un volumineux complexe enzymatique: le *protéasome*. Les cyclines sont dégradées en courts polypeptides puis en acides aminés qui peuvent être recyclés.

Le passage de l'autre point de contrôle, souvent appelé « Start » ou « Point de non-retour (R) », est une étape irréversible car la duplication, une fois engagée, doit arriver à son terme.

Le contrôle de ce passage est également assuré par des phosphorylations. La *cycline E* associée à CDK2 constitue une protéine kinase qui fixe un groupe phosphate sur une protéine particulière, *la protéine* Rb. Lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, cette protéine Rb est associée à des facteurs de transcription déclenchant la synthèse des ARN messagers codant pour les enzymes nécessaires à la réalisation de la phase S; dans ces conditions, celle-ci est bloquée. La fixation d'un groupe phosphate sur Rb libère les facteurs de transcription enclenchant ainsi la réplication. La fixation de ce phosphate est réalisée par une protéine kinase cycline-dépendante, le complexe cycline E-CDK2 *(fig. IX-52)*.

Des inhibiteurs de protéines kinases viennent compléter et affiner le mécanisme; ces **CKI** *(Cyclin Kinase Inhibitor)* sont de petites molécules de nature protéique, p16 et p21 entre autres, qui en se fixant sur les complexes cycline-kinase leur interdit de phosphoryler

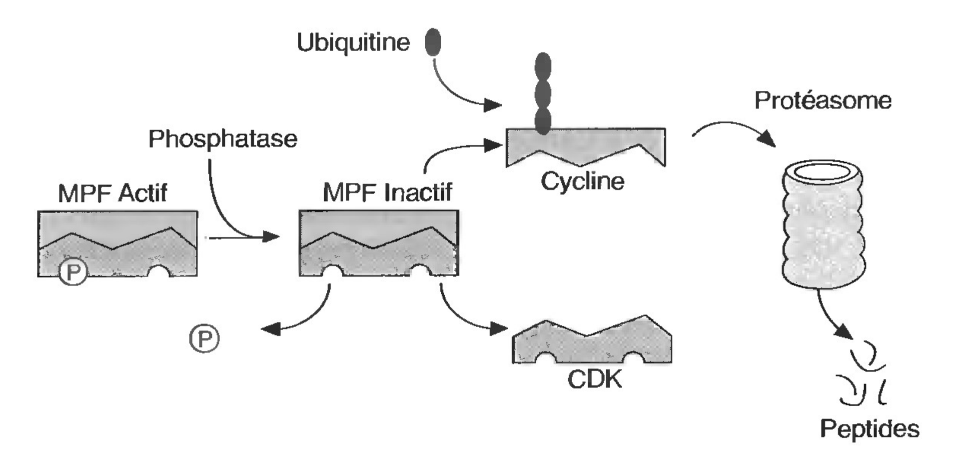


Fig. IX-51 : Destruction du complexe cycline-CDK : l'inactivation du MPF.
Une phosphatase élimine le groupe phosphate activateur du MPF; celui-ci devient alors inactif et ses deux composants, cycline et kinase, se dissocient. Tandis que la kinase CDK persiste sous forme inactive, la cycline est détruite par des protéases associées en un volumineux complexe, le protéasome. Celui-ci reconnaît les cyclines à détruire car elles sont liées à de petites molécules signal, les ubiquitines, qui les identifient comme molécules à détruire.

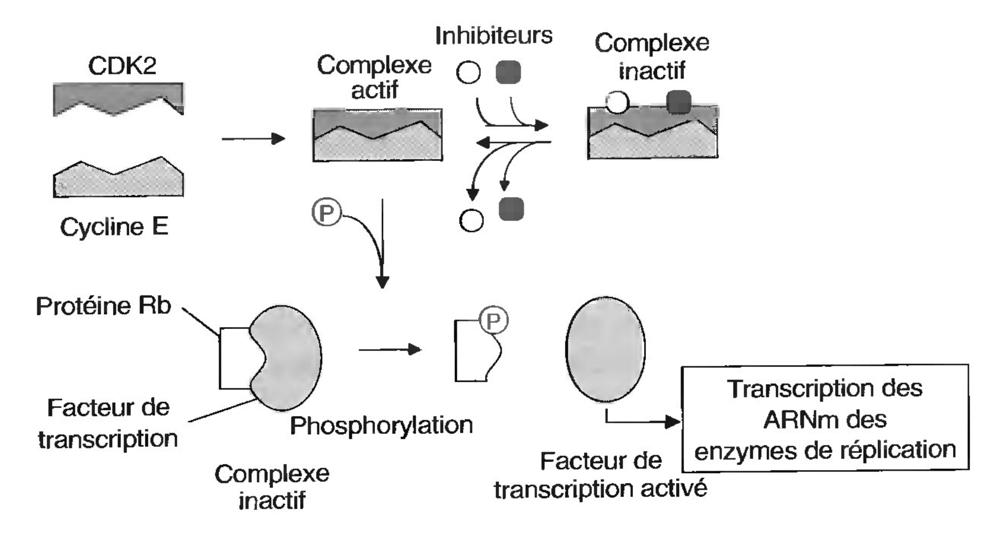


Fig. IX-52: Franchissement du point de non-retour (R) et entrée en phase S.
Les facteurs de transcription des ARN messagers codant les enzymes de réplication sont inhibés par liaison à une protéine dite protéine Rb. Une kinase constituée par l'association de CDK2 et de la cycline E fixe un groupe phosphate sur la protéine Rb. Celle-ci se sépare des facteurs de transcription qui peuvent alors déclencher la synthèse des ARN messagers codant les enzymes de réplication.
Des inhibiteurs peuvent être associés à CDK2, rendant alors l'activité enzymatique du complexe cycline-CDK impossible. Lorsque ces inhibiteurs sont éliminés, le complexe redevient fonctionnel.

Rb et donc de libérer les facteurs de transcription des enzymes assurant la réplication: la phase S ne démarre pas et, par conséquent, il n'y a pas de mitose. Ces petites molécules protéiques inhibitrices sont codées par des gènes qui sont eux-mêmes régulés par des signaux d'origine extra ou intracellulaire. Ainsi, lorsque l'ADN est endommagé, il y a augmentation, par des voies incomplètement comprises, de la concentration en protéines régulatrices comme la protéine p53; celle-ci stimule le gène codant la protéine p21, la réplication n'a pas lieu, le cycle est bloqué. Une mutation au niveau des gènes codant ces petites molécules inhibitrices a des conséquences importantes puisque, le complexe CDK2-cycline n'étant plus inhibé, les facteurs de transcription sont toujours disponibles, les réplications se succèdent rapidement: il y a cancérisation.

Le mode d'action des signaux extracellulaires commence à être connu. Ce sont généralement des facteurs de croissance qui se lient à la membrane plasmique; la transduction du signal provoque *une cascade de réactions* qui aboutissent à l'activation de kinases particulières, les kinases **MAP** *(Mitogen Activated Protein)*, qui pénètrent dans le noyau où elles phosphorylent les facteurs contrôlant la transcription des cyclines de G_1, notamment C et D, qui à leur tour activent la transcription des cyclines E et A nécessaires à l'entrée en phase S, puis celles indispensables au démarrage de la mitose *(fig. IX-53)*.

La régulation du cycle cellulaire est donc un mécanisme fort complexe qui commence seulement à être connu. ***Pour bien en comprendre le principe, il faut toujours prendre en compte qu'une activité kinase-cycline dépendante initie non seulement certains événements précis du cycle mais qu'elle induit aussi la formation des régulateurs de l'étape suivante et qu'elle inhibe ceux de la précédente.***

Les principaux résultats obtenus chez les amphibiens (développement des œufs de Xénope), surtout en ce qui concerne les aspects biochimiques, et les Levures, pour les aspects plus génétiques, ont permis de mettre en évidence des interactions qui gouvernent le bon déroulement du cycle et de déterminer quelques-uns des processus qui aboutissent à son dérèglement, laissant ainsi espérer une prochaine compréhension des mécanismes de la cancérisation.

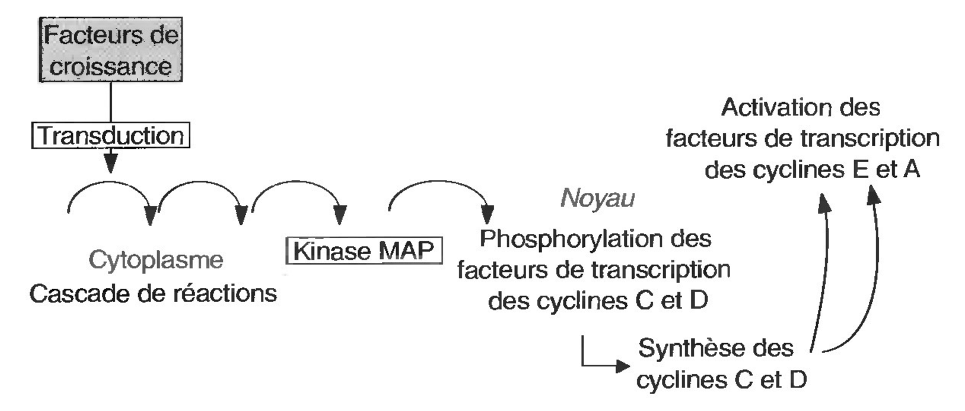


Fig. IX-53 : Mode probable de transduction du signal en phase G_1.

4. LE PARTAGE AVEC RÉDUCTION CHROMATIQUE : LA MÉIOSE

Comme le montre l'étude des cycles de développement (voir p. 359), la méiose permet la réduction qualitative précise du nombre des chromosomes ; c'est donc un mode de division très ordonné se distinguant très nettement de la mitose. Contrairement à cette dernière qui peut se répéter un très grand nombre de fois, c'est un phénomène unique, *initié une seule fois dans les cellules appelées à jouer un rôle reproducteur.*

4.1. LE DÉROULEMENT DE LA MÉIOSE

La méiose est précédée, comme la mitose, par une synthèse d'ADN permettant le doublement du stock chromosomique. Une analyse cytophotométrique comparable à celle réalisée pour définir le cycle cellulaire (voir p. 382) montre que la cellule est alors à 4n *(fig. IX-54)* ; ce sont donc deux divisions successives (M_1 et M_2) qui vont devoir se succéder pour réduire ce nombre à n.

La prophase de la première division, ou prophase I, est longue et complexe ; elle a été divisée par commodité en 5 stades.

Le stade **leptotène** correspond au début de condensation des chromosomes *(fig. IX-55, A)* : ils sont très longs, très fins, très enchevêtrés et, bien que la duplication de l'ADN ait eu lieu, les chromatides sœurs ne sont pas identifiables. Ces chromosomes dessinent alors des boucles plus ou moins grandes au sein du nucléoplasme.

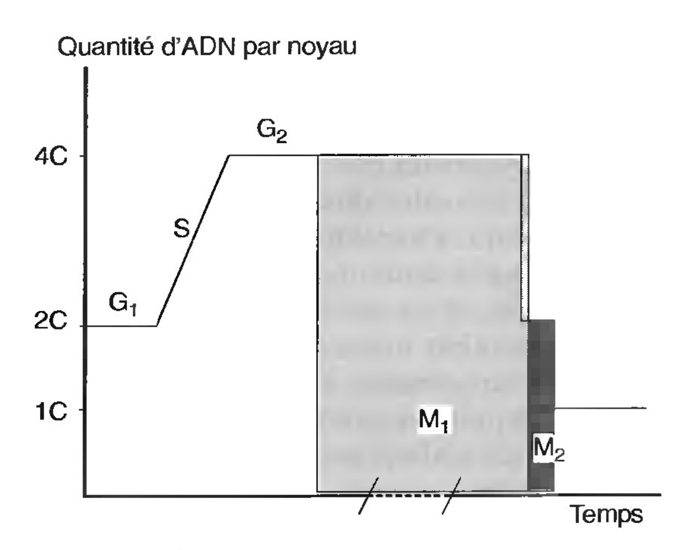


Fig. IX-54 : Évolution de la quantité d'ADN au cours de l'interphase préméiotique et pendant la méiose. La prophase de la division 1 étant particulièrement longue, l'échelle des temps a été fractionnée à son niveau par un pointillé. M_1, première division ; M_2, seconde division. Après deux divisions successives, la cellule, qu'une phase de synthèse avait rendue tétraploïde, donne naissance à quatre cellules haploïdes.

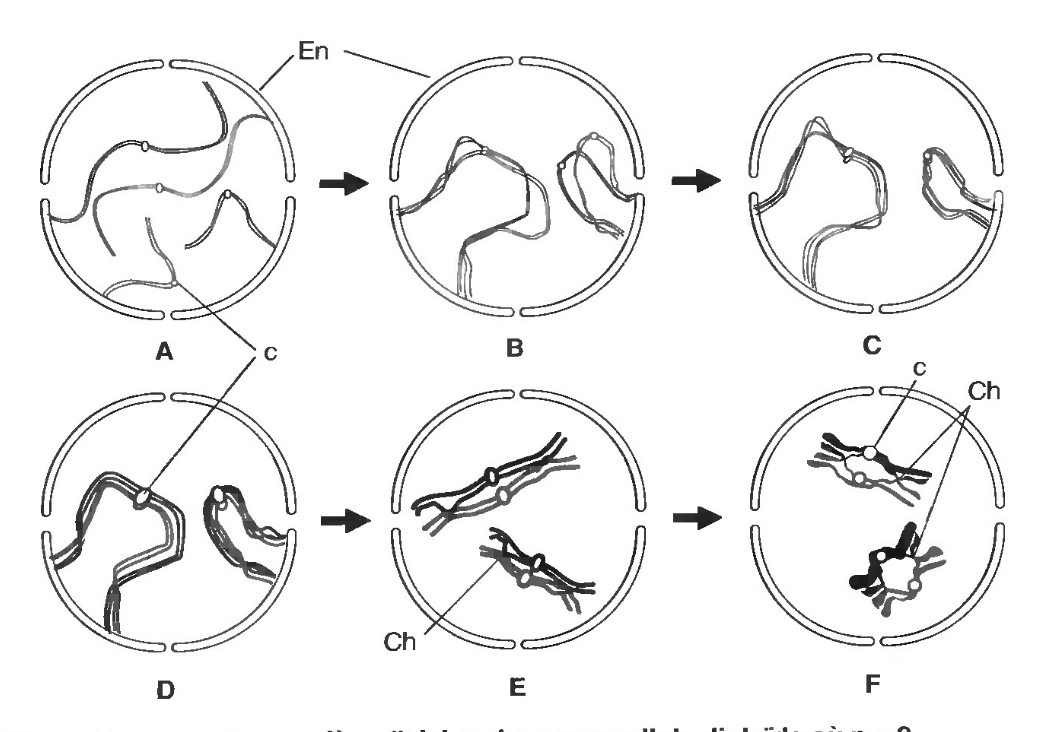


Fig. IX-55 : Méiose. Prophase de première division dans une cellule diploïde où n = 2.
Les chromosomes d'origine paternelle ont été figurés en noir, ceux d'origine maternelle en rouge.
A) Stade leptotène. Bien que les deux chromatides ne soient pas encore visibles en microscopie, elles ont été figurées sur ce schéma unies par le centromère (représenté sous forme d'un cercle clair).
B) Stade zygotène (début). Les chromosomes homologues commencent à s'apparier.
C) Stade zygotène (fin). Les chromosomes homologues sont étroitement associés ; ils forment des bivalents.
D) Stade pachytène. La condensation de plus en plus importante des chromosomes conduit à leur épaississement et à leur raccourcissement.
E) Diplotène. Les chiasmas sont identifiables car les chromosomes homologues ont tendance à se séparer.
F) Diacinèse. Les chromosomes homologues demeurent liés au niveau des chiasmas ; ils adoptent des figures en « O » ou en « X ».
c, centromère ; ch, chiasma ; en, enveloppe nucléaire.

Le stade **zygotène** correspond à l'appariement (ou synapsis) des chromosomes homologues, c'est-à-dire des deux chromosomes dont la forme, l'aspect, les dimensions sont rigoureusement identiques car, dans une cellule diploïde, l'un est d'origine paternelle, l'autre d'origine maternelle *(fig. IX-55, B)*. Lorsque l'appariement est complètement réalisé, les séquences nucléotidiques des deux homologues codant pour les mêmes gènes sont au même niveau. Les chromosomes homologues associés forment alors **un bivalent** *(fig. IX-55, C)*.

Au stade **pachytène**, les deux chromosomes appariés continuent à se condenser ; leur taille devient alors importante et il est souvent possible d'identifier les deux chromatides constituant chacun des chromosomes homologues : on parle alors de *tétrade (fig. IX-55, D)*.

Au stade **diplotène**, les homologues de plus en plus condensés et donc de plus en plus courts *(fig. IX-55, E)* ont tendance à se repousser et à s'éloigner l'un de l'autre. Ils restent toutefois associés car, en certains points, les chromatides des chromosomes appariés changent de partenaire : il en résulte la formation de **chiasmas**.

La **diacinèse** *(fig. IX-55, F)*, dernière étape de la prophase I, est caractérisée par la présence de figures en O ou en X *car, si les chromatides de chaque chromosome sont associées par leur centromère, les homologues ne le sont que par les chiasmas* qui occupent des positions différentes *(fig. IX-56)*.

L'enveloppe nucléaire disparaît et les chromosomes se disposent en plaque équatoriale. Les deux chromosomes homologues étant toujours associés par les chiasmas, *ce sont les*

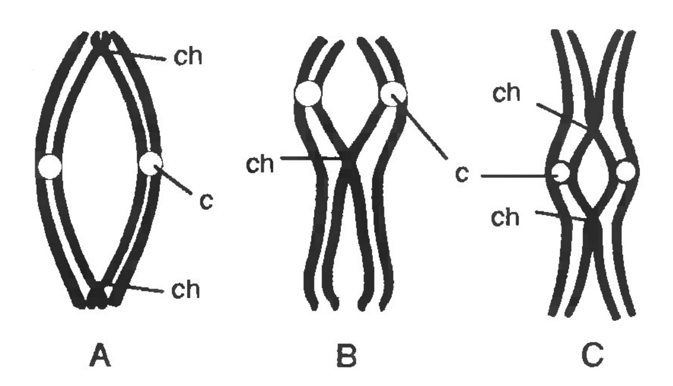


Fig. IX-56 : Position des chiasmas et aspects des chromosomes en diacinèse.
A) Forme en « O ».
B) Forme en « X ».
C) Forme en boucles multiples.
c, centromère ; ch, chiasma.

centromères de ces chromosomes qui sont disposés de part et d'autre du plan médian. C'est la **métaphase I** *(fig. IX-57, A).*

À l'**anaphase I**, *(fig. IX-57, B)* il y a donc migration vers les pôles de chacun des homologues, chacun constitué par deux chromatides unies par leur centromère.

À la **télophase I** l'état tétraploïde est réduit à un état diploïde mais celui-ci tient au fait que chaque chromosome comporte deux chromatides identiques ; ***l'étape essentielle de la méiose a été réalisée, chacun des homologues ayant été distribué à une cellule fille*** *(fig. IX-57, C).*

La **seconde division** suit la première généralement sans interruption car l'interphase est plus ou moins escamotée. Après la métaphase, il y a rupture des centromères des chromosomes et chaque chromatide d'un homologue gagne un pôle du fuseau à l'anaphase *(fig. IX-57, D).* La télophase II conduit ainsi à la formation de 4 cellules qui possèdent chacune un lot de chromosomes (n) ; elles sont **haploïdes.**

La conséquence de cette répartition des homologues est la séparation des caractères d'origine paternelle et maternelle portés par ces chromosomes. On peut le vérifier simplement chez un champignon très utilisé dans les laboratoires, *Sordaria.* Chez celui-ci la méiose suit immédiatement la fécondation. Dans le sac où elle se produit, *l'asque*, qui correspond à la paroi dilatée de la cellule-œuf, il se produit une division supplémentaire qui porte à huit le nombre des noyaux formés. L'intérêt de ce champignon * tient au fait que les spores qui s'organisent autour de ces noyaux sont disposées sur une seule file *(fig. IX-58)* dans laquelle *leur position est le reflet de l'ordre de leur formation (fig. IX-59)* car *les fuseaux de division sont toujours parallèles à l'axe d'élongation de l'asque.* Si on cultive sur un même milieu de culture deux souches haploïdes issues de spores de couleur différente, noire et claire (souches parentales), *et se distinguant par ce seul caractère* on peut obtenir divers types de fécondations : entre individus présentant le même caractère de couleur et les huit spores seront identiques (noires ou claires) ou entre individus différents et les asques contiendront quatre spores noires et quatre spores claires.

Si ce caractère de couleur sporale correspond à un même gène existant sous forme de deux allèles **, l'un dit sauvage (spores noires) et l'autre muté (spores claires), ces deux allèles seront présents dans le zygote, portés chacun par un chromosome homologue. La méiose, en rétablissant l'état haploïde va séparer ces homologues et donc le gène qu'ils portent ; une seule forme allélique sera présente dans chaque spore, les quatre blanches et les quatre noires seront généralement séparées, groupées par quatre *(fig. IX-58)*, ce que l'on peut facilement interpréter si l'on suit le devenir d'un couple de chromosomes homologues *(fig. IX-59).*

Cette observation indique qu'au cours du processus méiotique l'élément clef est l'***appariement des chromosomes homologues*** puisqu'il permet de réduire, au cours de l'anaphase I, le génome du zygote en un nombre haploïde où chaque homologue est représenté en un seul exemplaire formé par deux chromatides associées au niveau de leur

* Et de la plupart des champignons du groupe auquel il appartient, les Ascomycètes. Toutefois, les levures font, entre autres, exception puisque leur asque ne comprend que 4 spores (voir fig. IX-1, p. 359).

** Allèles : versions d'un gène modifiées par mutation. Ils occupent **la même position sur les homologues** : ***ils ont le même locus.***

Fig. IX-57 : Méiose. Fin de première division (I) et deuxième division (II).

A) Métaphase I. Séparation des homologues ; les chromatides sœurs demeurent liées par le centromère.
B) Anaphase I.
C) Fin de première division ; les noyaux fils reconstitués contiennent chacun un exemplaire de chaque homologue.
D) Anaphase II.
E) Résultat de la méiose, formation de quatre cellules haploïdes.

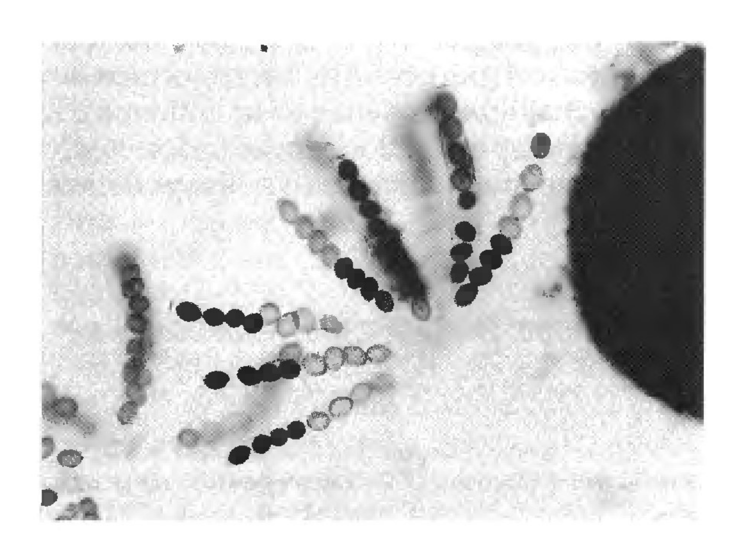


Fig. IX-58 : Asques libérés par écrasement d'un périthèce de Sordaria obtenu après croisement de deux souches différant par la couleur des spores. La répartition des quatre spores noires et des quatre spores claires est le résultat d'une séparation des homologues en anaphase I.
(Cliché M. JULLIEN.)

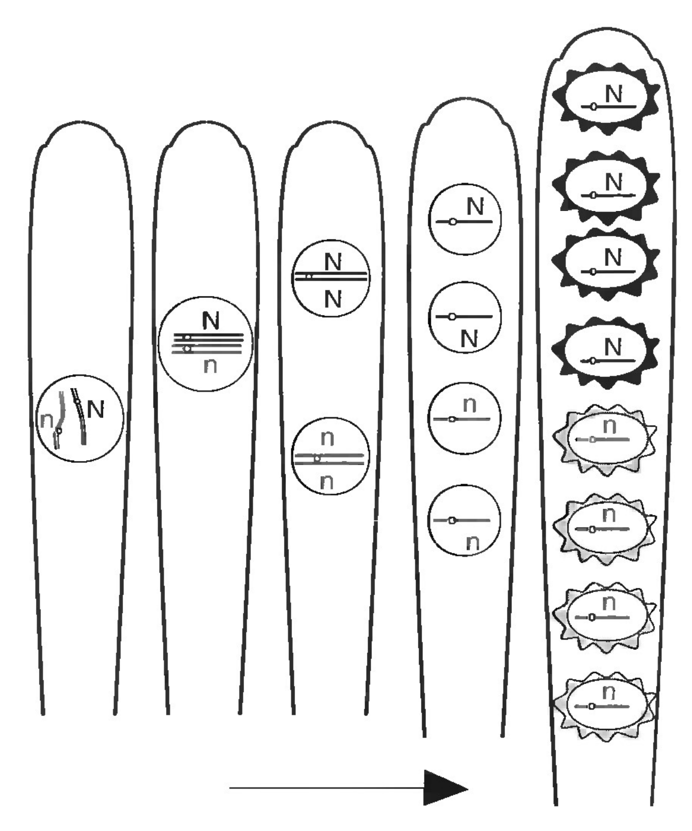


Fig. IX-59: Devenir d'un couple de chromosomes homologues chez les Ascomycètes où une mitose suit immédiatement la méiose.
Une chromatide porte le gène sauvage, couleur noire des spores (N), et l'autre l'allèle responsable de la couleur claire (n).

centromère. Cet appariement, qui s'accompagne de la formation de chiasmas, mérite, dans un premier temps, une étude plus approfondie.

4.2. APPARIEMENT DES CHROMOSOMES; LE COMPLEXE SYNAPTONÉMAL

L'appariement est réalisé au cours du stade zygotène par rapprochement des chromosomes individualisés au leptotène *(fig. IX-55, A)*. À ce dernier stade, un constituant ou élément dense apparaît *entre les chromatides sœurs de chaque chromosome*; il occupe une position centrale. D'abord discontinu, il s'étend progressivement et intéresse rapidement toute la longueur chromosomique *(fig. IX-60, A)*. *Cet élément central ne correspond pas à un constituant associé parallèlement au nucléofilament*; en effet, lorsqu'on compare la longueur de tous les éléments centraux édifiés dans un noyau à celle de l'ADN, on constate que cette dernière est très nettement supérieure; seule une faible partie de la molécule d'ADN de chaque chromatide est donc associée à l'élément central, le reste formant des boucles autour; on suppose que certaines séquences d'ADN particulières sont impliquées dans cette association.

Au début du zygotène, il se produit *une rotation des chromatides sœurs* autour de l'élément qui était jusqu'alors central *(fig. IX-60, B)*; il devient ainsi un *élément latéral* entièrement exposé vers le nucléoplasme.

L'appariement lui-même, ou ***synapsis***, est réalisé en deux temps: un appariement gros-

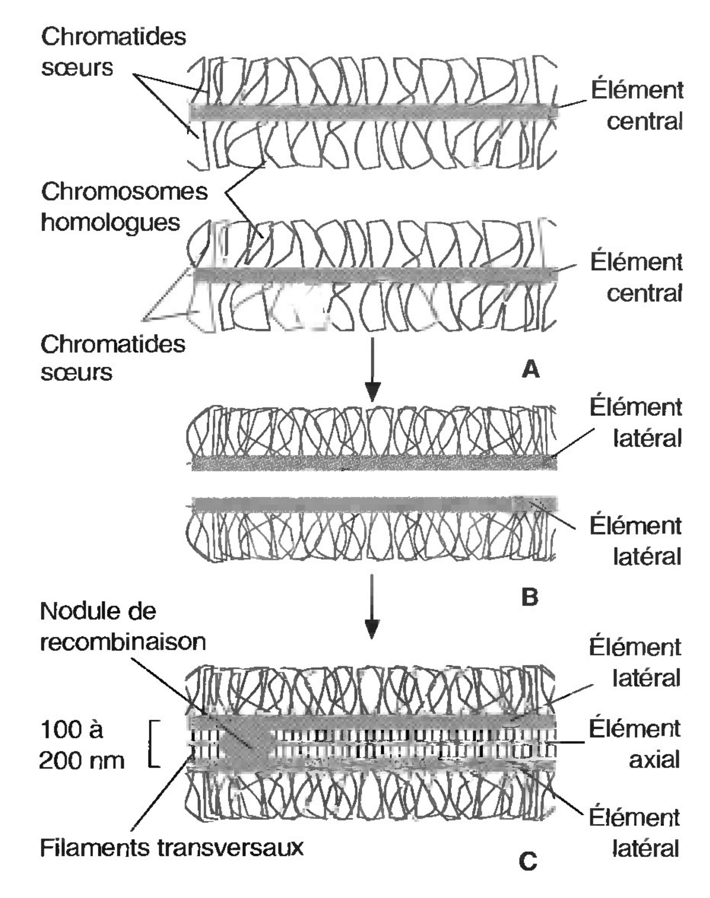


Fig. IX-60: Formation d'un complexe synaptonémal.
A) Leptotène. Les chromatides sœurs liées chacune à un élément central par certains points seulement décrivent des boucles dans le nucléoplasme.
B) Rotation des chromatides sœurs autour de l'élément central qui devient ainsi latéral.
C) Association des homologues.
(D'après G.S. ROEDER, 1990.)

sier qui place les éléments latéraux à environ 300 nm l'un de l'autre; un alignement plus précis qui les situe à moins de 100 nm. Ce rapprochement des homologues s'accompagne de leur association à un troisième élément occupant une position axiale *(fig. IX-60, C)*. Une structure tripartite est ainsi constituée, c'est le ***complexe synaptonémal*** *(fig. IX-61)*. La cohésion et la stabilité de celui-ci sont assurées par des filaments transversaux qui maintiennent les distances d'alignement. La mise en place de proche en proche de cette nouvelle forme d'organisation conduit à une disposition rigoureusement parallèle des homologues.

Sous sa forme définitive *(fig. IX-61)*, le complexe synaptonémal est constitué par deux éléments latéraux de 40 nm d'épaisseur séparés par un espace médian de 100 nm de large qui contient l'élément axial de 10 à 20 nm d'épaisseur. L'association entre l'élément axial et les éléments latéraux est assurée par une série de filaments transversaux de 2 nm.

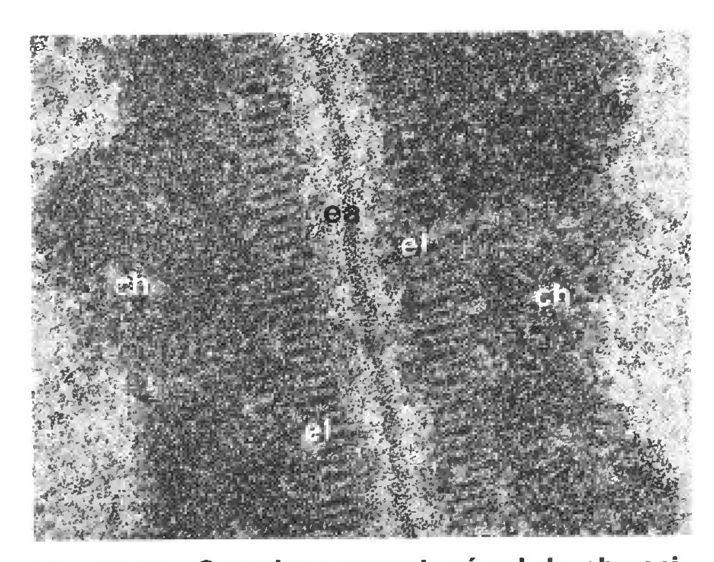


Fig. IX-61 : Complexe synaptonémal du champignon *Ascomycète Neotiella* rutilans observé en coupe longitudinale en microscopie électronique par transmission.
On peut identifier l'élément axial du complexe (ea), de 18 nm d'épaisseur environ, auquel sont associés, par l'intermédiaire d'éléments latéraux striés (el), les chromosomes homologues (ch) constitués chacun par deux chromatides.
G. x 100 000.
(Reproduit de D. VON WETTSTEIN et al. *The synaptonemal complex and for-strand crossing over. Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68: 851-855.)*

L'association des homologues et la formation du complexe synaptonémal débutent souvent au niveau des télomères; ce n'est toutefois pas une règle générale puisqu'elles sont initiées dans certains cas en des points localisés le long des chromosomes, correspondant probablement à des sites de reconnaissance précis.

Au zygotène l'appariement s'accompagne régulièrement de l'imbrication (*interlocking* des anglo-saxons) de chromosomes *non homologues*, soit qu'un élément latéral d'un bivalent partiellement apparié soit pris entre les deux homologues d'un autre bivalent lui-même partiellement apparié, soit qu'un bivalent apparié soit pris entre les éléments latéraux d'un autre bivalent en cours d'appariement *(fig. IX-62)*. Cette imbrication est due à l'enchevêtrement des chromosomes au leptotène et au zygotène; *elle n'a aucun rapport avec les crossing-over* (ou échange de chromatides) dont nous verrons ci-dessous tout l'intérêt. La résolution de ces imbrications fait intervenir des *enzymes spécifiques*, du type de l'ADN topo-isomérase II, susceptibles de provoquer des ruptures transitoires de la double hélice.

Aucune explication générale de l'appariement n'est pleinement satisfaisante; actuellement, on pense que cette ***étroite association des chromosomes homologues est initiée très tôt, avant le zygotène***, et qu'elle implique l'intervention de certains complexes enzymatiques identifiables sous forme de nodules denses *(fig. IX-63)*.

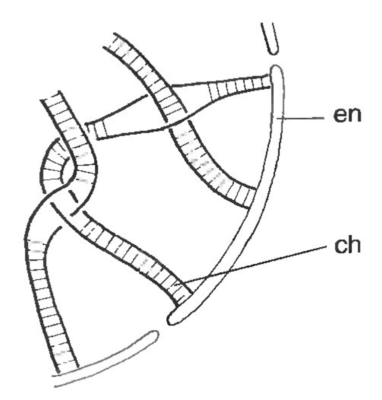
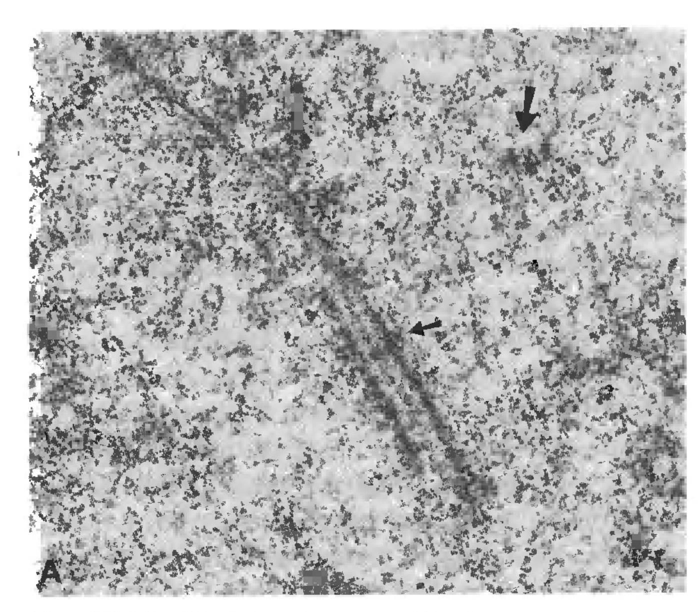


Fig. IX-62 : Imbrication *(interlocking)* des chromosomes homologues.
ch, chromosomes appariés; en, enveloppe nucléaire.



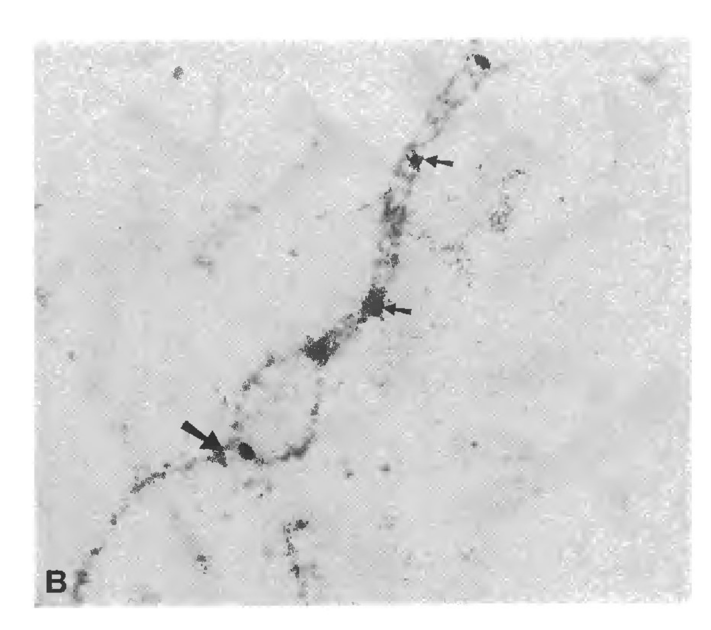


Fig. IX-63: Nodules de recombinaison.

A) Section ultrafine d'un microsporocyte de tomate coloré par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Des nodules de recombinaison sont visibles sur l'élément central du complexe synaptonémal, aussi bien sur les sections longitudinales (petite flèche) que sur les transversales (grosse flèche). G. x 25 000.

(Reproduit de S.M. STACK et L. ANDERSON. Two dimensional spreads of synaptonemal complexes from solaneous plants. III. Recombination nodules and crossing-over in Lycopersicon esculentum *(Tomato). Chromosoma 1986; 94: 253-258.)*

B) Étalement de complexes synaptonémaux de sporocytes de Psilotum au zygotène. Certains nodules sont situés au centre de complexes déjà formés (petite flèche) alors que d'autres (grosse flèche) constituent le point de convergence de deux éléments latéraux non encore associés, c'est-à-dire avant la mise en place de l'élément central; on suppose donc qu'ils pourraient intervenir dans l'appariement synaptique. G. x 10 000.

(Cliché L.K. ANDERSON et S.M. STACK.)

4.3. CHIASMAS, *CROSSING-OVER* ET RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE

Les chiasmas sont rencontrés au cours de la méiose chez la plupart des espèces et ils jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'association entre les homologues. En effet, après le stade pachytène, les complexes synaptonémaux disparaissent progressivement; c'est au niveau des chiasmas qu'ils persistent le plus longtemps.

Avec la disparition des complexes, l'attraction synaptique cesse et les chromosomes homologues ont tendance à se séparer, sauf, bien entendu, au niveau des chiasmas; selon la localisation de ces derniers, la forme des bivalents change, en O, en X ou en une succession de boucles.

Comme l'ont montré les colorations de bivalents après utilisation du bromodéoxyuridine (BrdU), les chiasmas correspondent à des échanges de chromatides entre chromosomes homologues *(fig. IX-64)*; ce sont donc des enjambements ou, pour employer le terme consacré, des ***crossing-over***. Cet échange nécessite d'abord une coupure des deux chromatides impliquées puis une soudure des fragments conduisant à une association nouvelle de segments polynucléotidiques, différente de celle existant à l'origine; ***il y a recombinaison génétique***. Coupure et soudure doivent être extrêmement précises et réalisées *sans retrait ni ajout de nucléotides*. Le mécanisme moléculaire est encore largement spéculatif; son étude sort du cadre de cet ouvrage; on en trouvera l'exposé détaillé dans les volumes consacrés à la biologie moléculaire.

Étant donné le degré de compaction atteint par l'ADN aux stades zygotène et pachytène, on pense que les *crossing-over* potentiels sont *présélectionnés*; leur réalisation implique en effet une proximité des chromatides, au niveau



Fig. IX-64: Mise en évidence de *crossing-over* sur des chromosomes de cellules de hamster.

Le BrdU (bromodésoxyuridine) est un analogue de la thymine qu'il peut remplacer dans la synthèse de l'ADN. Après deux réplications, les chromosomes des cellules cultivées en présence de BrdU contiennent une chromatide où les deux brins sont substitués et une chromatide où un seul brin l'est. Ces deux chromatides se colorent alors différemment par les colorants fluorescents: celle contenant le BrdU sur les deux brins est moins intensément colorée que celle où un seul brin est substitué.

On peut ainsi visualiser les échanges de chromatides (flèches) correspondant au *crossing-over.*

(Reproduit de S.H. WOLFF et P. PERRY. Insights on chromosome structure from sister chromatid exhange ratios and the lack of both isolabelling as determined by the FPG technique. Exptl Cell Res 1975; 93: 23-30.)

où doit se faire l'échange, très inférieure à celle obtenue par la mise en place des complexes synaptonémaux.

Un autre point qui doit être souligné concerne la complexité du processus au niveau moléculaire et le nombre des enzymes devant intervenir dans un ordre bien déterminé pour réaliser la recombinaison; on suppose que ces enzymes sont groupées en volumineux complexes multienzymatiques que l'on pense associés aux *nodules de recombinaison*. Ce sont des structures protéiques denses, sphériques ou ellipsoïdales, de 90 à 100 nm de diamètre environ; ils sont disposés entre deux chromosomes homologues au centre du complexe synaptonémal *(fig. IX-63, A)* et sont relativement faciles à identifier en microscopie électronique car ils sont très colorables par les contrastants usuels.

Leur intervention dans le processus du *crossing-over* est établie par des arguments indirects: leur nombre et leur distribution correspondent à ceux des chiasmas et des zones de plus haute fréquence de recombinaison; la synthèse d'ADN au pachytène, mise en évidence par incorporation de ^{3}H thymidine, est située à leur niveau; leur nombre diminue en général entre le zygotène et le pachytène, ce qui suggère que toutes les recombinaisons réalisées par les nodules de petit diamètre ne conduisent pas à des *crossing-over.* En fait le mécanisme régulant leur distribution à l'intérieur des bivalents n'est pas connu.

En conclusion, on pense actuellement que c'est en début de prophase, peut-être même en interphase préméiotique, que les chromosomes homologues, ou des segments de chromosomes homologues, sont identifiés et que les premiers contacts sont établis entre eux. Ces régions, reconnues comme homologues et rapprochées, sont ensuite connectées par le complexe synaptonémal qui est en lui-même indifférent à l'homologie. À l'intérieur de la charpente macromoléculaire formée par le complexe synaptonémal, l'appariement précis de séquences d'ADN peut être réalisé, ce qui garantit une rigoureuse réciprocité des échanges. Il paraît raisonnable de penser que la présélection des homologues et l'appariement précis des segments d'ADN, indispensable à la réalisation des *crossing-over*, sont séparés dans le temps et réalisés par des mécanismes différents.

4.4. LA SÉGRÉGATION DES CHROMOSOMES

Lorsque le complexe synaptonémal disparaît à la fin du pachytène, les chromosomes homologues ont tendance à se séparer; à ce moment, ils demeurent associés uniquement par les chiasmas, c'est-à-dire par les enjambements ou *crossing-over.*

À la fin de la diacinèse, la rupture de l'enveloppe permet aux microtubules polaires de pénétrer dans la zone nucléaire, certains

s'associant aux kinétochores. *Le positionnement correct des homologues en plaque métaphasique est dû à la situation particulière des kinétochores* : ceux des chromatides sœurs, appartenant donc au même homologue, sont orientés vers le même pôle, alors que les deux autres, appartenant au chromosome homologue du même bivalent, sont orientés vers le pôle opposé. Durant toute la prométaphase, les bivalents se déplacent entre les deux pôles selon un mouvement oscillant dont l'amplitude décroît progressivement si bien qu'ils s'installent à l'équateur ; les tensions s'exerçant sur les kinétochores opposés étant égales, le point d'équilibre est en effet atteint. *Chaque bivalent est alors orienté indépendamment des autres*, c'est-à-dire que, par rapport au plan métaphasique, certains chromosomes d'origine paternelle sont situés vers un pôle, les autres vers le second pôle ; il en est de même pour ceux d'origine maternelle. **Chaque cellule fille reçoit ainsi une association chromosomique différente de celle des gamètes ayant donné naissance au zygote**.

La séparation des bivalents au niveau des chiasmas semble résulter de la dissociation des chromatides sœurs de chaque homologue ; les bivalents peuvent alors se séparer et gagner les pôles. En règle générale, dès la fin de la première division, la seconde débute ; il n'y a en effet pas de phase de synthèse. La prophase est toujours très rapide et, après rupture de l'enveloppe nucléaire, les centromères des deux chromatides sœurs, le plus souvent bien séparés ce qui différencie cette seconde division d'une mitose ordinaire, sont alors dirigés vers les pôles opposés. La plaque métaphasique se forme et, lorsque les centromères sont dissociés, chaque chromatide gagne un des pôles. Quatre cellules haploïdes sont alors formées.

En raison du mode particulier de formation des spores chez les champignons Ascomycètes comme *Sordaria*, un *crossing-over* peut être visualisé s'il a été réalisé entre chromatides appartenant à deux homologues ; la séparation des deux formes alléliques ne se produit pas en effet à l'anaphase I comme nous l'avons vu dans l'exemple de la *figure X-59*, mais à l'anaphase II (*fig. IX-65 et 66*). Dans le

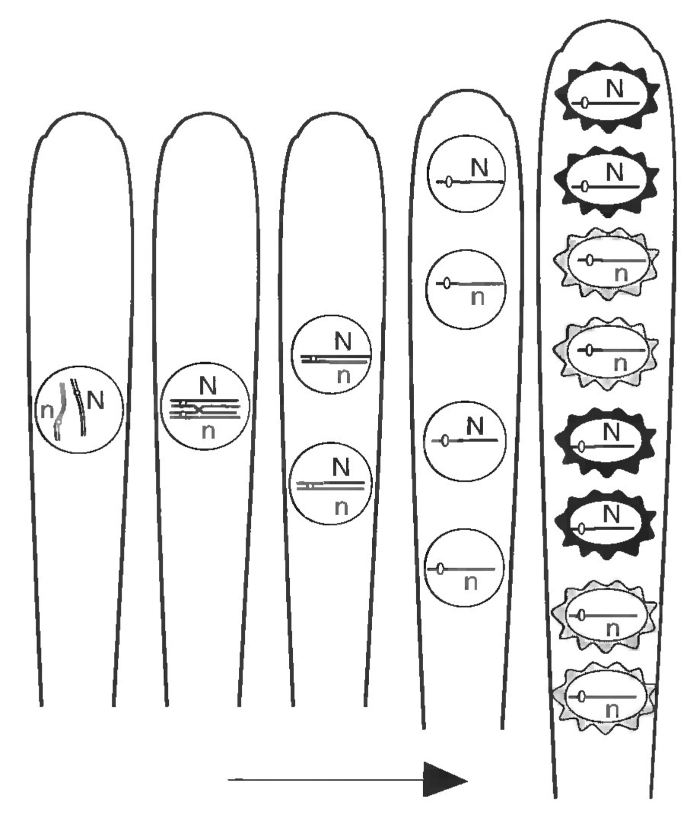


Fig. IX-65 : Devenir d'un couple de chromosomes homologues chez un Ascomycète lorsqu'il s'est produit un crossing-over.
Les caractères concernés, N et n, ne se séparent pas à la fin de la première division mais au cours de la seconde : il y a postréduction.

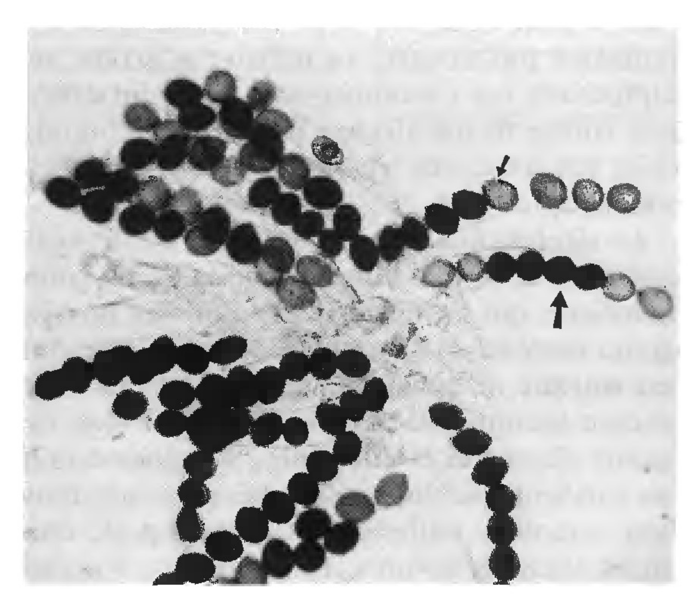


Fig. IX-66 : Asques préréduit (petite flèche) et postréduit (grosse flèche) chez *Sordaria*.
(Cliché M. JULLIEN.)

premier cas, où les caractères N et n ont été séparés à l'anaphase I, *il y a préréduction*, dans le second, où ils n'ont été disjoints qu'en anaphase II, *il y a postréduction*.

4.5. DURÉE ET DÉCLENCHEMENT DE LA MÉIOSE

La méiose est généralement moins longue chez les végétaux que chez les animaux ; il n'y a pas notamment cet arrêt qui, chez les mammifères et les amphibiens, se produit durant la gamétogenèse femelle et peut se prolonger plusieurs années.

La durée totale du processus méiotique est variable d'une espèce à l'autre et dépend des conditions de l'environnement (température notamment). Chez le lis par exemple, sa durée peut varier entre 7 et 15 jours et c'est toujours la prophase I qui est la plus longue : le leptotène et le zygotène durent entre 5 et 7 jours, le pachytène nécessite de 5 à 10 jours, le diplotène et la diacinèse, plus rapides, sont réalisés en 24 heures. Chez les rongeurs, comme la souris mâle, sa durée est de 12 jours : leptotène-zygotène, 3 jours ; pachytène, 5 ou 6 jours ; du diplotène jusqu'à la fin de la seconde division, 3 jours. Chez l'homme, elle se poursuit pendant 24 jours avec une répartition de durée entre les phases assez comparable à celle observée chez la souris. Chez les femelles par contre, la méiose s'arrête au diplotène ; les chromosomes adoptent alors une forme déspiralisée ; la méiose reprend, chez les ovocytes ayant survécu, plusieurs années après.

Le déclencheur de la méiose, facteur responsable de la transition du mode de division mitotique, qui se répète le plus souvent un très grand nombre de fois, au mode méiotique, qui est **unique**, c'est-à-dire le *commutateur*, est encore inconnu. Il semble bien qu'il soit de nature chimique et diffusible. Son élaboration ne survient que lorsque certaines conditions sont remplies ; celles-ci ont beaucoup été étudiées chez les levures. Comme nous l'avons vu (p. 359), ces champignons unicellulaires peuvent être soit haploïdes (existant sous deux formes a et α), soit diploïdes (aα). Dans les cellules diploïdes, la méiose peut être induite, ce qui conduit à la formation de quatre ascospores (deux seront à l'origine de souches a, les deux autres à celle des formes α).

Trois conditions sont nécessaires pour que se produise l'entrée en méiose : un milieu nutritif insuffisant (carencé en azote et glucose) suggérant que la formation d'ascospores est un moyen pour échapper à des conditions défavorables ; que le cycle mitotique précédent soit achevé, l'induction méiotique ne pouvant intervenir qu'en phase G_1 ; que les cellules concernées soient diploïdes, c'est-à-dire qu'elles contiennent les deux caractères a et α, ce qui implique un contrôle génétique.

Une fois le processus induit, le début de la phase S est le signal de l'entrée en méiose. Le contrôle de son déroulement ne diffère pas fondamentalement de celui de la mitose : ce sont des phosphorylations dont la succession est régulée par les cyclines (voir p. 399).

4.6. IMPORTANCE DE LA MÉIOSE : LA FORMATION DE NOUVELLES ASSOCIATIONS GÉNIQUES

Dans les cellules diploïdes, les chromosomes homologues portent les gènes hérités des cellules parentales haploïdes. Au cours de la méiose, la répartition de ces gènes est affectée doublement.

1. Au moment de l'anaphase de première division, les bivalents s'orientent indépendamment les uns des autres et des chromosomes ayant la même origine, paternelle ou maternelle, peuvent gagner des pôles opposés. Les associations chromosomiques de chaque gamète parental ne se retrouvent plus dans les cellules haploïdes qui viennent d'être formées *(fig. IX-57, E)*. ***Il y a brassage génétique***, les cellules, produits de la méiose, ayant comme équipement chromosomique un mélange de chromosomes paternels et maternels dont la composition est due au hasard ; si **n** est le nombre haploïde de chromosomes, il y a 2^n combinaisons possibles. La méiose a donc

une importance considérable mais, si le seul mode de ségrégation des gènes était celui lié à la répartition aléatoire des chromosomes d'un bivalent, il n'y aurait pas de véritables combinaisons géniques nouvelles puisque tous les gènes portés par un même chromosome sont transmis en bloc ; ***le brassage est là, interchromosomique.***

2. Les associations géniques nouvelles sont le résultat des *crossing-over*; ceux-ci, en associant sur une même chromatide des gènes qui étaient à l'origine localisés sur des chromatides différentes par leur origine paternelle ou maternelle, permet la formation de nouvelles associations de caractères *(fig. IX-67)*; tous les caractères portés par un même chromosome ne sont plus transmis en bloc ; *il y a recombinaisons*: ***le brassage génétique est intrachromosomique***, il y a modification de la composition du matériel héréditaire ce qui, d'un point de vue évolutif, est d'une importance considérable.

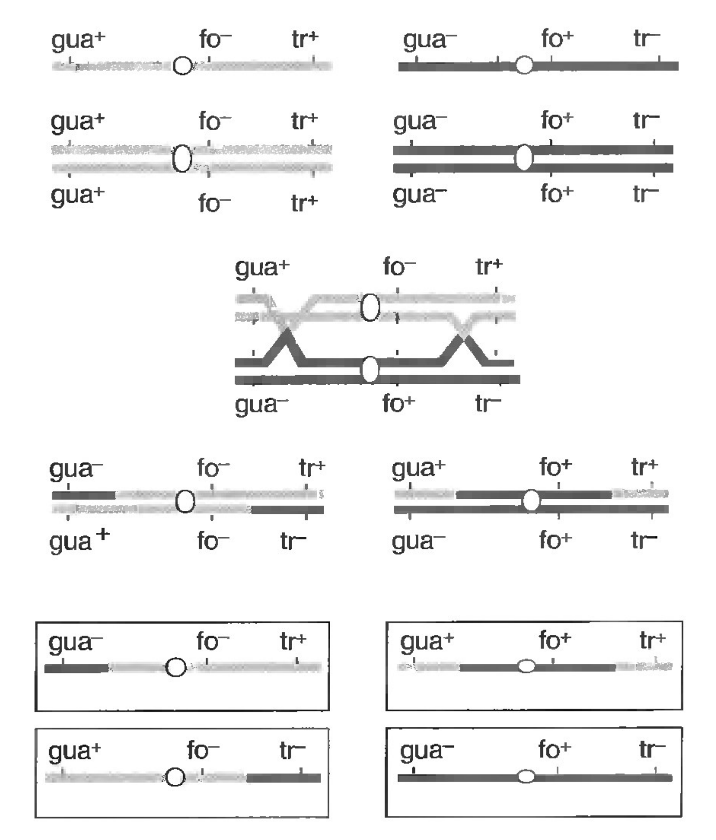


Fig. IX-67 : Crossing-over et recombinaison intrachromosomique.

La souche sauvage d'un champignon à mycélium végétatif haploïde est capable de synthétiser le tryptophane et la guanine (base purique de l'ADN) car elle possède les gènes codant pour les enzymes catalysant les réactions qui conduisent à l'élaboration de ces molécules (tr^+ et gua^+) ; elle peut donc se développer sur un milieu simple contenant des éléments minéraux, une source de carbone et de la biotine ; elle est par contre très sensible à l'action de certains antifongiques car elle contient l'allèle muté du gène codant pour l'enzyme capable de les dégrader (fo^-). Une autre souche ne peut pas synthétiser le tryptophane ni la guanine car elle possède les allèles mutés (tr^- et gua^-), par contre elle résiste aux antifongiques (fo^+).

Le schéma montre comment des crossing-over, intervenant dans les asques obtenus par croisement de ces deux souches, permettent la formation de spores contenant les trois allèles+, c'est-à-dire un équipement chromosomique nouveau. C'est cette recombinaison intrachromosomique qui joue un rôle déterminant dans l'adaptation d'une espèce à un environnement nouveau (voir p. 360).

CHAPITRE X

Conclusion

Les cellules, qui constituent les unités morphologiques et fonctionnelles du monde vivant, sont réparties en deux grands groupes, les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes, distinguées dans un premier temps par la façon dont leur matériel génétique est organisé. Nous avons vu qu'en réalité les différences sont beaucoup plus profondes et ne se limitent pas au seul territoire « nucléaire », en prenant ce terme dans son sens le plus général, c'est-à-dire incluant le nucléoïde et le noyau. La différence essentielle tient en fait à l'importante compartimentation du cytoplasme des cellules eucaryotes, le noyau étant un compartiment particulier, et à la présence d'organites à double membrane, les mitochondries et, dans les cellules végétales, les plastes.

On peut donc logiquement s'interroger sur l'intérêt que présentent, pour la cellule eucaryote, la mise en place d'une compartimentation et l'existence de mitochondries et de plastes.

L'ensemble des réactions qui assurent la synthèse des molécules et des macromolécules (anabolisme) ou leur dégradation (catabolisme) constitue le métabolisme. Les réactions se déroulent dans la cellule, mais ne se produisent pas brutalement: la dégradation complète d'une molécule, comme le glucose par exemple, libère une quantité d'énergie telle que la cellule ne pourrait pas la récupérer en totalité; il y aurait alors production de chaleur qui, élevant la température, provoquerait de graves lésions dans l'organisation cellulaire. De même, la synthèse, en une seule étape, d'une molécule complexe nécessiterait une quantité d'énergie si importante que la cellule ne pourrait pas la mobiliser instantanément. Comme nous l'avons vu au cours des chapitres qui précèdent, *ces réactions se produisent par étapes*; il y a transformation progressive : un produit A donne un produit B, lui-même transformé en un produit C qui donne le produit D. Le passage direct de A à D est impossible; le passage progressif l'est.

À la température ambiante, ces réactions ne se produisent pas spontanément ou, si elles le font, sont extrêmement lentes. En conséquence, dans la cellule, *chaque réaction est catalysée.* Les catalyseurs biologiques sont les *enzymes* et nous avons vu que, contrairement aux catalyseurs minéraux, les enzymes sont généralement spécifiques; il s'ensuit que pour chaque réaction il existe une enzyme déterminée. La molécule A est le substrat de l'enzyme, et la molécule B formée est le produit, mais dans la chaîne de réactions ci-dessous, si B est le produit de E_1 il est aussi le substrat de E_2.

$$\begin{array}{ccccccc} A & \rightarrow & B & \rightarrow & C & \rightarrow & D \\ & \uparrow & & \uparrow & & \uparrow & \\ & E_1 & & E_2 & & E_3 & \end{array}$$

En conséquence, la vitesse avec laquelle le produit D est obtenu à partir de A dépend des probabilités de rencontre entre chaque enzyme et son substrat: A avec E_1; B avec E_2; C avec E_3.

L'optimisation du processus peut être réalisée de plusieurs manières *(fig. X-1)*.

1) Lorsque *les enzymes sont groupées en complexes*, ce sont les **complexes multienzymatiques**.

Dès que le produit B est formé par action de E_1 sur A, il se trouve à proximité de l'enzyme E_2 qui réalise immédiatement sa transformation.

2) Lorsque les enzymes spécifiques d'une suite de réactions sont situées dans un petit volume délimité, dans **un compartiment spécifique**; l'agitation thermique suffit alors; les probabilités de rencontre entre les différentes enzymes et leurs substrats sont élevées.

3) Lorsque les enzymes (ou même des complexes enzymatiques) situées à proximité les unes des autres **sont liées à une membrane**; celle-ci sert de support et maintient les catalyseurs biologiques à une distance optimale les uns des autres. Les réactifs sont situés, dès leur formation, à proximité de l'enzyme dont ils sont le substrat.

Ces mécanismes entrent en jeu simultanément dans les cellules; par exemple, chez une bactérie, il y a de nombreux complexes multienzymatiques, le volume cellulaire reste suffisamment petit pour que les probabilités de rencontre soient importantes et de nombreuses enzymes, celles de la chaîne respiratoire notamment, sont liées à la membrane plasmique.

La bactérie peut fonctionner parfaitement si ses dimensions restent faibles; sa taille est donc limitée. Que se produit-il, en effet, lorsque la taille augmente? En premier lieu, les enzymes ou les complexes multienzymatiques dispersés dans le cytoplasme sont de plus en plus espacés et les probabilités de rencontre entre enzymes et substrats sont de plus en plus réduites. Ensuite, la membrane plasmique ne suffit plus à assurer sa double fonction, production d'ATP et échanges avec l'environnement; en effet, lorsqu'une cellule supposée sphérique s'élargit, la surface augmente plus lentement (carré du rayon: R^2) que le volume (cube du rayon: R^3); très rapidement échanges et production d'énergie deviennent insuffisants pour répondre aux besoins du métabolisme. Le transfert d'une fonction de cette membrane sur une structure interne, la mitochondrie, permet alors d'augmenter la surface membranaire disponible pour les échanges. Par ailleurs, la formation de petits compartiments bien délimités, assurant chacun un nombre limité de réactions, permet aux enzymes solubles d'être mieux utilisées.

Un exemple permet de démontrer l'intérêt de cette compartimentation. La glycolyse, transformation du glucose en acide pyruvique,

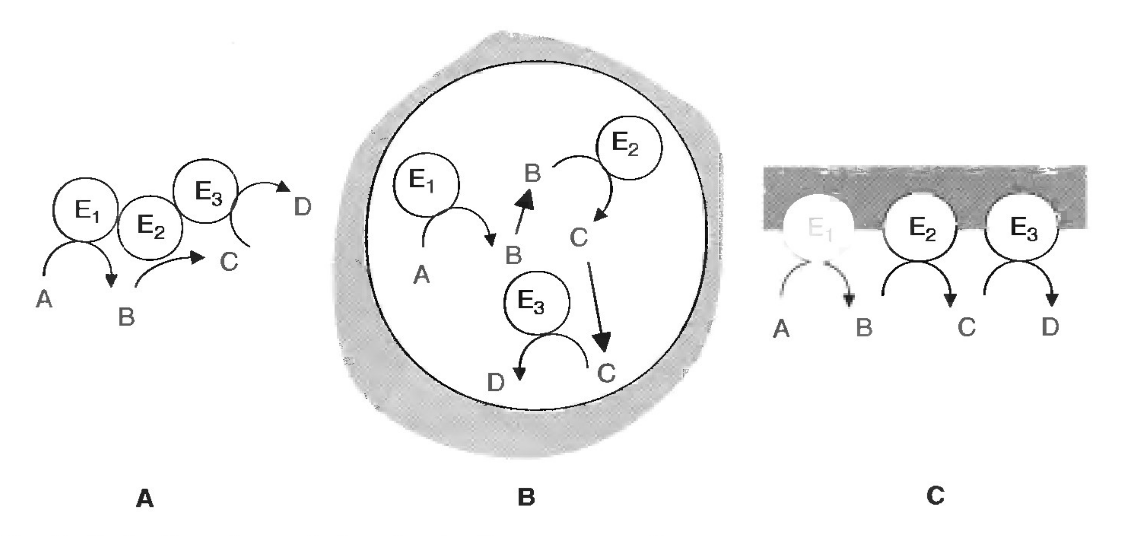


Fig. X-1 : Optimisation d'une chaîne de réactions enzymatiques.

A) Par formation de complexes multienzymatiques.

B) Par localisation dans un compartiment de volume réduit limité par une membrane de type plasmique.

C) Par insertion dans une membrane support.

nécessite, nous l'avons vu, dix réactions successives, chacune d'entre elles catalysée par une enzyme spécifique. Dans toutes les cellules, procaryotes ou eucaryotes, ces enzymes sont dispersées dans le cytosol. Dans toutes les cellules, sauf celles de protozoaires parasites, *les trypanosomes* (dont certains sont responsables de troubles graves comme la maladie du sommeil). Dans celles-ci, en effet, il existe un compartiment particulier, *le glycosome*, où sont **enfermées les 7 premières enzymes de la glycolyse**. On constate que, dans ces cellules, la dégradation du glucose en acide pyruvique est réalisée 50 fois plus vite que dans les autres cellules eucaryotes, y compris celles de l'hôte qui abrite le trypanosome.

La cellule eucaryote a donc eu la possibilité de fonctionner de manière optimale et sa taille a pu augmenter, elle a pu développer des systèmes complexes ayant permis la spécialisation et donc la constitution d'organismes pluricellulaires.

La complexité structurale des Eucaryotes, comparée à la relative simplicité des Procaryotes, suggère que les premières ont évolué à partir des secondes. Effectivement, on trouve dans les sédiments les traces de Procaryotes (– 3,5 milliards d'années environ) bien avant celles des Eucaryotes (– 1,5 milliard). Il faut toutefois noter que :

– *aucune forme intermédiaire n'est actuellement connue* entre les deux types de cellules ;

– *la différence entre une cellule procaryote et une cellule eucaryote est extrêmement importante* ; elle se situe à tous les niveaux, moléculaire, cellulaire, morphologique, comme physiologique. Cette différence est plus importante que celle existant entre organismes animaux et végétaux et, si on doit couper le monde vivant en deux grands ensembles, c'est certainement entre Procaryotes et Eucaryotes qu'il faut situer la frontière.

Comme il n'existe aucune forme intermédiaire entre Procaryotes et Eucaryotes, on est réduit à des suppositions quant aux modalités du passage de l'un à l'autre.

La théorie qui semble être la plus crédible actuellement suppose qu'une bactérie aurait acquis des propriétés membranaires particulières lui permettant d'invaginer certaines portions de sa membrane plasmique, autorisant l'absorption de particules par endocytose, d'une part, et la formation de compartiments, d'autre part. Cet Eucaryote primitif, tout à fait hypothétique, aurait été capable d'absorber des eubactéries et des Procaryotes proches des cyanobactéries sans toutefois les digérer ; il se serait ainsi créé une association à bénéfices réciproques, une symbiose, qui aurait abouti à la formation de cellules animales, lorsque seules des bactéries ont été absorbées, ou de cellules végétales, lorsque eubactéries et cyanobactéries ont été associés (*fig. X-2*). C'est **la théorie dite endosymbiotique**, qui s'appuie sur de nombreux arguments biochimiques, comme nous l'avons vu notamment à propos de la structure et des modalités du fonctionnement du génome des plastes et des mitochondries.

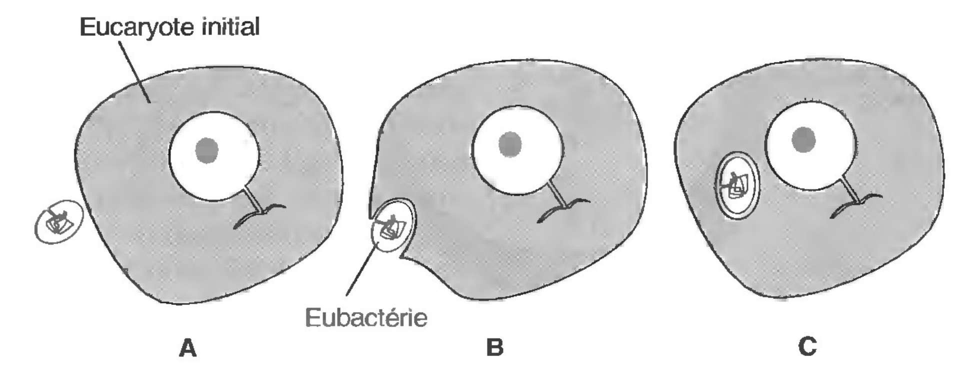


Fig. X-2 : L'origine des mitochondries et des plastes.
Les mitochondries proviendraient d'eubactéries qui auraient été incorporées par un eucaryote ancestral. L'origine des plastes serait comparable ; ces organites résulteraient de l'association symbiotique d'un Procaryote chlorophyllien voisin des cyanobactéries et d'un Eucaryote primitif possédant déjà des mitochondries.

Si cette conception de l'association symbiotique est satisfaisante pour expliquer l'origine des organites, plastes et mitochondries, elle n'apporte aucune lumière en ce qui concerne l'origine du noyau, qu'on peut logiquement considérer comme la première manifestation de l'état eucaryote.

Les avancées sont venues de travaux récents de phylogénie moléculaire, fondés sur les homologies de séquences des ARNr mais surtout, depuis peu, sur celles de protéines hautement conservées et rencontrées dans les différents territoires et organites cellulaires dont elles sont spécifiques, comme les HSP 70 et 90, ces protéines chaperons dont nous avons à maintes reprises signalé l'intervention. En montrant que, par exemple, les hsp mitochondriales avaient des séquences plus proches de celles des bactéries que de celles du cytoplasme, ces travaux ont confirmé que l'endosymbiose est bien l'un des mécanismes impliqués dans la formation des cellules eucaryotes et ont permis d'émettre une nouvelle hypothèse.

Pour comprendre celle-ci, il faut savoir que le monde procaryote est en fait divisé en deux grands groupes, les *Archebacteria*, d'origine très ancienne, dont les représentants actuels vivent dans des conditions extrêmes (sources hydrothermales, milieux salés...) et possèdent de nombreuses particularités biochimiques (ADN polymérases comparables à celles des eucaryotes, pas de peptidoglycanes pariétaux, membrane plasmique de composition différente de celle des autres organismes...) et les *Eubacteria*, qui correspondent à toutes les autres formes, y compris les cyanobactéries. Ces deux groupes auraient divergé très tôt à partir d'un ancêtre initial.

D'après les études récentes, le génome de la cellule eucaryote aurait une double origine (*fig. X-3*), archébactérienne et eubactérienne et serait dû à l'absorption par endocytose primitive d'une archébactérie dans une eubactérie Gram négative supposée dépourvue de paroi; l'archébactérie ingérée aurait très rapidement perdu sa membrane plasmique, devenue inutile. Des membranes résultant de l'internalisation d'une partie de la membrane plasmique de l'eubactérie auraient isolé plus ou moins l'archébactérie : ces invaginations seraient à l'origine de l'enveloppe nucléaire et du réticulum endoplasmique. La migration ultérieure du matériel génétique de l'eubactérie vers le territoire nucléaire et son association à celui de l'archébactérie auraient permis la formation du génome complexe de la cellule eucaryote initiale; toutes les autres cellules à noyau dériveraient de cet ancêtre. Les mitochondries et les plastes auraient été mis en place plus tardivement, par endosymbioses successives avec des eubactéries pourpres et des cyanobactéries, conduisant ainsi à la diversification que nous connaissons actuellement.

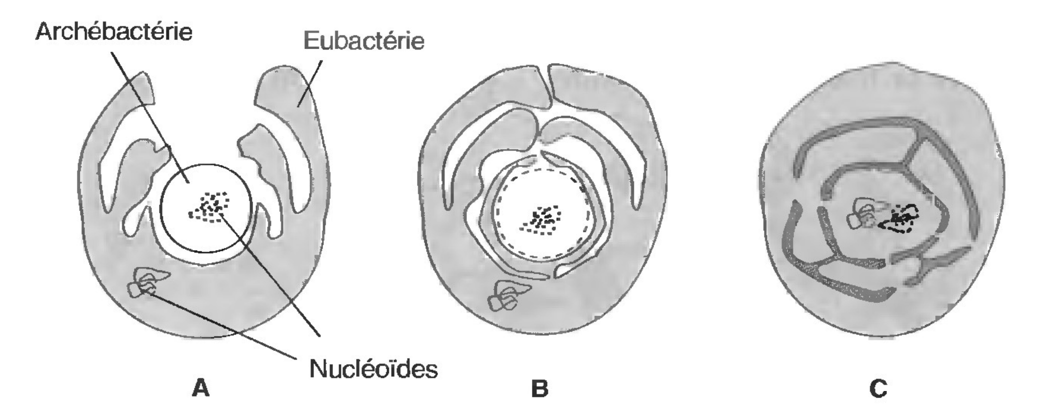


Fig. X-3 : Origine du noyau et du système endomembranaire dans le modèle dit « chimérique ».
A) Une eubactérie à Gram négatif, dépourvue de paroi, aurait incorporé une archébactérie.
B) La membrane de l'archébactérie incluse dans le cytoplasme de l'hôte disparaît.
C) La séparation des membranes internalisées serait à l'origine du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire. Les nucléoïdes des deux partenaires se trouvent associés dans ce nouveau compartiment.
(D'après R.S. GUPTA et G.B. GOLDING. The origin of the eukaryotic cell. TIBS 1996 ; 21 : 166-171.)

Les recherches faisant appel aux techniques les plus modernes semblent donc confirmer cette origine endosymbiotique de la cellule eucaryote, scénario qui avait pourtant été proposé dès le milieu du XIXe siècle. Le modèle actuel peut expliquer les nombreux caractères génétiques, structuraux, biochimiques des cellules eucaryotes qui les opposent aux actuelles eubactéries ; il ne rend toutefois pas compte de certains aspects essentiels, qui font également l'originalité des cellules eucaryotes, comme par exemple l'existence d'un cytosquelette. De nombreux points restent donc à élucider.

Les organismes sont, pour la plupart, constitués par un nombre très élevé (plusieurs millions, voire plusieurs centaines de millions) de cellules ; celles-ci dérivent toutes d'une cellule unique, l'œuf ou zygote, qui lui-même résulte de l'union d'un gamète mâle, le spermatozoïde, et d'un gamète femelle, l'ovule (chez les animaux) ou l'oosphère (chez les végétaux) : c'est la fécondation.

Sans entrer dans le détail des modalités de la construction des êtres vivants, qui sont le sujet d'autres disciplines biologiques, il est intéressant de montrer, dans cette conclusion, l'importance que joue la structure cellulaire de base dans l'édification des organismes.

Fondamentalement, on peut distinguer deux formes d'organisation des cellules eucaryotes : celle où les cellules sont limitées par une paroi et celle où elles en sont dépourvues.

Les animaux sont des organismes où les cellules sont « nues », c'est-à-dire limitées par la seule membrane plasmique, à l'extérieur de laquelle on trouve la matrice extracellulaire ; pratiquement toutes les cellules sont bien individualisées, plus ou moins isolées les unes des autres et pourvues d'un cytosquelette bien développé et diversifié. Pour édifier l'organisme, l'œuf va subir un nombre important de divisions, orientées de manières très diverses, c'est la segmentation qui conduit à la formation d'un embryon globulaire *(fig. X-4, A)* ; celui-ci va être l'objet d'intenses remaniements au cours desquels les cellules se déplacent, se regroupent pour constituer des ensembles cellulaires aux caractères identiques formant des ébauches de tissus (B). Une réorganisation de ces derniers, impliquant de nombreux déplacements cellulaires, va conduire à la mise en place d'ébauches d'organes (tube nerveux, tube digestif, foie...) qui, bien que reliés les uns aux autres, demeurent relativement indépendants (C). *Ce sont donc les déplacements cellulaires et la reconnaissance des cellules entre elles qui permettent la formation des tissus, puis celle des organes.*

Les végétaux sont par contre des organismes où les cellules, souvent vacuolisées, sont limitées par une paroi plus ou moins rigide, le cytosquelette étant relativement réduit. Après fécondation, l'œuf subit, là aussi, un nombre important de divisions qui autorisent la formation d'un embryon globulaire où les principaux organes du jeune végétal se mettent progressivement en place. La paroi limitant considérablement le déplacement cellulaire, *c'est l'orientation des divisions qui déterminera l'architecture de l'organisme* ; le positionnement de l'anneau préprophasique,

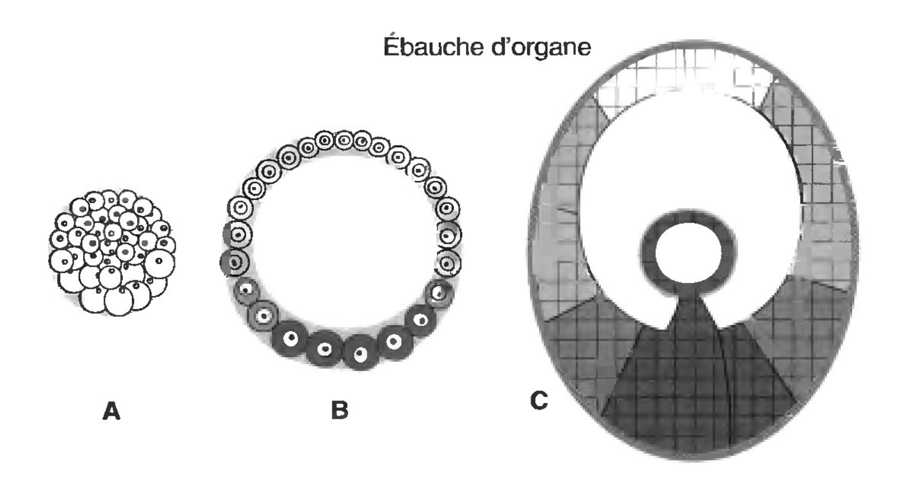


Fig. X-4 : Représentation schématique de la formation des tissus et des organes chez les animaux.

qui définit le futur plan de bipartition cellulaire est donc un élément essentiel dans la formation du végétal. Une autre distinction fondamentale entre végétaux et animaux tient au fait que chez les premiers, les tissus ne sont pas isolés les uns des autres; ils sont associés par leur paroi *(fig. X-5)*. Celle-ci est en outre un élément primordial de différenciation, puisqu'elle peut acquérir des particularités (épaississement, modification de ses constituants) définissant les caractéristiques tissulaires (A, B, C). Ainsi, la mise en place et la différenciation des tissus est radicalement différente de celle rencontrée chez les animaux. Le cytoplasme de cellules végétales contiguës est, nous l'avons vu, en continuité par l'intermédiaire des plasmodesmes, ces microperforations qui traversent la paroi: l'individualité des cellules n'est pas aussi réelle que chez les animaux *(fig. X-A et B). Une part essentielle de l'information nécessaire à la différenciation des cellules transite par ces plasmodesmes: lorsque, entre deux cellules, ces derniers sont ouverts, les cellules en continuité suivent la même voie pour se spécialiser (A puis B); lorsque ces communications sont obturées (C), les cellules ainsi séparées évoluent de manière différente.* Ceci permet de comprendre pourquoi dans un végétal deux cellules contiguës, ayant donc une paroi commune, peuvent avoir des caractéristiques fondamentalement divergentes. Les tissus peuvent ainsi s'organiser sans que la continuité des parois soit interrompue, la rigidité introduite par ces dernières est en effet une condition essentielle pour le maintien du végétal dans son milieu.

Un troisième groupe d'organismes présente d'autres caractéristiques cellulaires, ce sont les champignons. Limités par une paroi, dont la nature est différente de celle des végétaux, les cellules de ces organismes n'ont pas la faculté d'orienter de manière très variée leurs fuseaux de division: ces derniers sont toujours longitudinaux et les mitoses sont limitées à la cellule terminale et aux cellules sous-jacentes*: il s'ensuit que des divisions répétées conduisent à la formation d'un filament (fig. X-6, A)*. Des ramifications se forment plus loin de l'apex, par reprise d'une activité mitotique, mais les fuseaux étant orientés perpendiculairement aux précédents, c'est un nouveau filament, indépendant, qui est mis en place (B). La structure des champignons est donc essentiellement filamenteuse; ils se dispersent dans le milieu sous cette forme. Ils peuvent toutefois constituer des ensembles cohérents, comme le chapeau des champignons supérieurs, *mais c'est secondairement, par association latérale de filaments que se forment ce qu'il est convenu d'appeler des « faux tissus »* (C); ces associations, d'importance toujours limitée, mettent en jeu des protéines hydrophobes excrétées vers l'extérieur de la paroi;

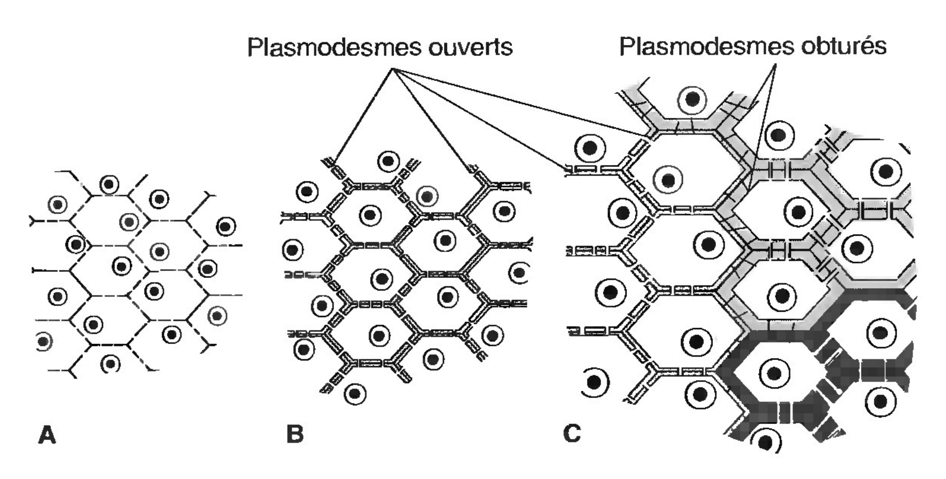


Fig. X-5: Différenciation des tissus chez un organisme végétal.
Dans un tissu jeune, les plasmodesmes, nombreux, établissent une certaine continuité entre les cellules (A); lorsqu'ils demeurent fonctionnels, toutes les cellules subissent une évolution comparable (B); par contre, leur obturation entraîne l'individualisation de groupes cellulaires aux caractéristiques structurales et fonctionnelles différentes (C).

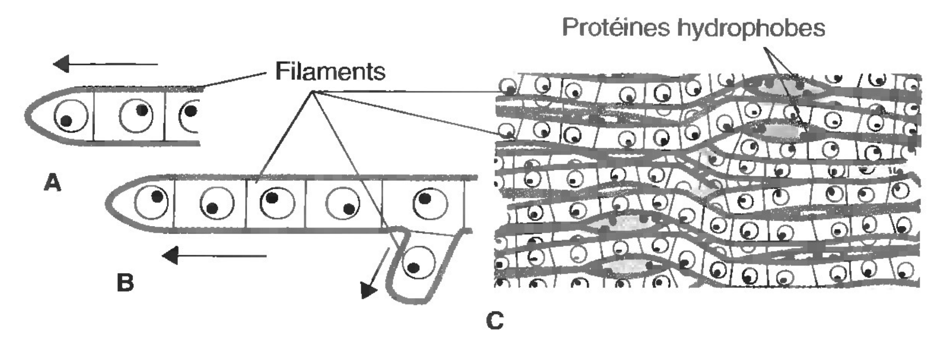


Fig. X-6 : Chez les champignons.
La structure de l'appareil végétatif est de type filamenteux (A) ; des ramifications peuvent se former latéralement, mais sans association des filaments produits (B) ; lorsque celle-ci se réalise, c'est secondairement, par regroupements de filaments recouverts d'une couche protéique hydrophobe (C). (Les flèches indiquent l'orientation des divisions).

elles favorisent le regroupement des filaments dans le milieu riche en eau où se développent ces organismes.

En conséquence, on peut dire que la distinction entre les trois grands groupes du monde eucaryote tire son origine des caractéristiques des cellules les constituant ; d'un point de vue évolutif c'est donc **une divergence très précoce qui a permis l'émergence des grands ensembles biologiques observés dans le monde actuel** ; on peut la situer peu après la réalisation des endosymbioses ayant édifié les cellules à noyau vrai.

Index